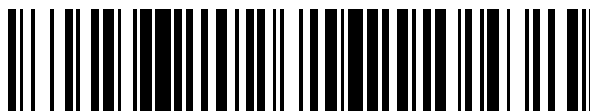


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 146**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2016** **PCT/US2014/039109**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014** **WO14190137**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2014** **E 14730051 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018** **EP 2999785**

54 Título: **Composiciones de ARNi de Serpina1 y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

22.05.2013 US 201361826125 P
01.11.2013 US 201361898695 P
15.04.2014 US 201461979727 P
06.05.2014 US 201461989028 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
17.07.2018

73 Titular/es:

ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
300 Third Street, 3rd Floor
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

SEHGAL, ALFICA;
CHARISSE, KLAUS;
BETTENCOURT, BRIAN;
MAIER, MARTIN;
RAJEEV, KALLANTHOTTATHIL G.;
HINKLE, GREGORY y
MANOHARAN, MUTHIAH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 676 146 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de ARNi de Serpina1 y métodos de uso de las mismas

Serpina1 codifica alfa-1-antitripsina que se compleja predominantemente con e inhibe la actividad de elastasa de neutrófilos producida por hepatocitos, monocitos mononucleares, macrófagos alveolares, enterocitos y células mieloides. Sujetos que tienen variaciones en una o ambas copias del gen Serpina1 pueden padecer deficiencia de alfa-1-antitripsina y están en riesgo de desarrollar enfisema pulmonar y/o enfermedad hepática crónica debido a actividad de elastasa superior a la normal en los pulmones e hígado.

En sujetos afectados, la deficiencia en alfa-1-antitripsina es una deficiencia de alfa-1-antitripsina funcional no mutante. En algunos casos, un sujeto que tiene una variación en una o ambas copias del gen Serpina1 es portador de un alelo nulo. En otros casos, un sujeto que tiene una variación en una o ambas copias del gen Serpina1 es portador de un alelo deficiente.

Por ejemplo, un sujeto que tiene un alelo deficiente de Serpina1, tal como el alelo PIZ, puede estar produciendo proteínas erróneamente plegadas que no pueden ser apropiadamente transportadas desde el sitio de síntesis hasta el sitio de acción dentro del cuerpo. Tales sujetos normalmente están en riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar y/o hepática. Sujetos que tienen un alelo nulo de Serpina1, tales como PINULL (Granite Falls), normalmente solo están en riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar.

La enfermedad hepática resultante de la deficiencia de alfa-1 antitripsina es el resultado de formas de variante de alfa-1-anti-tripsina producidas en células del hígado que se pliegan erróneamente y, así, no son fácilmente transportadas fuera de las células. Esto conduce a una acumulación de proteína erróneamente plegada en las células del hígado y puede producir una o más enfermedades o trastornos del hígado que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad hepática crónica, inflamación del hígado, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular.

Actualmente hay opciones muy limitadas para el tratamiento de pacientes con enfermedad hepática que surge de la deficiencia de alfa-1-antitripsina, que incluye vacunación contra la hepatitis, tratamiento de apoyo y evitación de agentes perjudiciales (por ejemplo, alcohol y AINE). Aunque está disponible terapia de sustitución de alfa-1-antitripsina, tal tratamiento no tiene impacto sobre la enfermedad hepática en estos sujetos y, aunque el trasplante de hígado puede ser eficaz, es un procedimiento difícil, caro y arriesgado y los hígados no están fácilmente disponibles.

Por consiguiente, existe una necesidad en la materia de tratamientos eficaces para enfermedades asociadas a Serpina1, tales como una enfermedad hepática crónica, inflamación del hígado, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular.

La presente invención se define por las reivindicaciones. En particular, se refiere a un agente de iARN bicatenario para inhibir la expresión de Serpina1 en una célula,

en el que dicho agente de iARN bicatenario comprende una hebra codificante y una hebra no codificante que forman una región bicatenaria,

en el que dicha hebra codificante comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 11, y dicha hebra no codificante comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, o SEQ ID NO: 25,

en el que sustancialmente todos los nucleótidos de dicha hebra codificante comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación de 2'-O-metilo y una modificación de 2'-flúor,

en el que dicha hebra codificante comprende dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5',

en el que sustancialmente todos los nucleótidos de dicha hebra no codificante comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación de 2'-O-metilo y una modificación de 2'-flúor,

en el que dicha hebra no codificante comprende dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5' y dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 3',

en el que dicha hebra codificante está conjugada con uno o más derivados de GalNAc unidos mediante un conector bivalente o trivalente ramificado en el extremo 3', en el que "sustancialmente todos" los nucleótidos que están modificados significa que no más de 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos están sin modificar.

Como se describe en más detalle a continuación, en el presente documento se desvelan composiciones que comprenden agentes, por ejemplo, polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios, por ejemplo, agentes de iARN, por ejemplo, agentes de ARNi bicatenarios, que se dirigen a Serpina1. También se desvelan métodos de uso de las composiciones de la invención para inhibir la expresión de Serpina1 y para tratar enfermedades asociadas a Serpina1, por ejemplo, enfermedad hepática crónica, inflamación del hígado, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación proporciona agentes de iARN bicatenario para inhibir la expresión de Serpina1 en una célula. Los agentes de iARN bicatenario comprenden una hebra codificante y una hebra no codificante que forman una región bicatenaria, en los que la hebra codificante comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 11, y la hebra no codificante comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, o SEQ ID NO: 25,

en los que sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra codificante y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra no codificante son nucleótidos modificados, y en los que la hebra codificante está conjugada con un ligando unido en el extremo 3'.

En una implementación, una de las 3 diferencias de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la hebra no codificante es un desapareamiento de nucleótido en la región semilla de la hebra no codificante. En una realización, la hebra no codificante comprende una base universal en el nucleótido desapareado.

En una implementación, todos los nucleótidos de la hebra codificante y todos los nucleótidos de la hebra no codificante son nucleótidos modificados.

En una implementación, la hebra codificante y la hebra no codificante comprenden una región de complementariedad que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias enumeradas en una cualquiera de las Tablas 1, 2, 5, 7, 8 y 9.

En una implementación, al menos uno de los nucleótidos modificados está seleccionado del grupo que consiste en un nucleótido de desoxi-timina (dT) del extremo 3', un nucleótido modificado con 2'-O-metilo, un nucleótido modificado con 2'-flúor, un nucleótido modificado con 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido modificado con 2'-amino, un nucleótido modificado con 2'-alquilo, un nucleótido de morfolino, un fosforamidato, un nucleótido que comprende base no natural, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato y un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterilo o un grupo bisdecilamida de ácido dodecanoico.

En una implementación, al menos una hebra comprende un nucleótido protuberante de 3' de al menos 1 nucleótido.

En otra implementación, al menos una hebra comprende un nucleótido protuberante de 3' de al menos 2 nucleótidos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona agentes de iARN, por ejemplo, agentes de iARN bicatenario, que pueden inhibir la expresión de Serpina1 en una célula, en los que el agente de iARN bicatenario comprende una hebra codificante sustancialmente complementaria a una hebra no codificante, en los que la hebra no codificante comprende una región sustancialmente complementaria a parte de un ARNm que codifica Serpina1, en los que cada hebra tiene aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, en los que el agente de iARN bicatenario se representa por la fórmula (III):

sentido: $5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3'$

antisentido: $3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q' 5'$ (III)

en la que:

i, j, k y l son cada uno independientemente 0 o 1;

p, p', q y q' son cada uno independientemente 0-6;

cada N_a y N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos que están tanto modificados como sin modificar o combinaciones de los mismos, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

cada N_b y N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos que están tanto modificados como sin modificar o combinaciones de los mismos;

cada n_p , n_p' , n_q y n_q' , cada uno de los cuales puede o puede no estar presente, representa independientemente un nucleótido protuberante;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' y Z'Z'Z' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos;

- 5 modificaciones en N_b se diferencian de la modificación en Y y modificaciones en N_b' se diferencian de la modificación en Y'; y

en los que la hebra codificante está conjugada con al menos un ligando.

- 10 En una implementación, N_a' comprende 1-25 nucleótidos, y en la que uno de las 1-25 nucleótidos en una de las posiciones 2-9 del extremo 5' es un desapareamiento de nucleótido. En una implementación, la base desapareada es una base universal.

En una implementación, i es 0; j es 0; i es 1; j es 1; tanto i como j son 0; o tanto i como j son 1. En otra implementación, k es 0; l es 0; k es 1; l es 1; tanto k como l son 0; o tanto k como l son 1.

En una implementación, XXX es complementario a X'X'X', YYY es complementario a Y'Y'Y' y ZZZ es complementario a Z'Z'Z'.

- 15 En una implementación, el motivo YYY se produce en o cerca del sitio de escisión de la hebra codificante.

En una implementación, el motivo Y'Y'Y' se produce en las posiciones 11, 12 y 13 de la hebra no codificante desde el extremo 5'.

En una implementación, Y' es 2'-O-metilo.

En una implementación, la fórmula (III) se representa por la fórmula (IIIa):

sentido: $5' n_p-N_a-YYY-N_a-n_q 3'$
antisentido: $3' n_p-N_a-Y'Y'Y'-N_a'-n_q' 5'$ (IIIa).

- 20 En otra implementación, la fórmula (III) se representa por la fórmula (IIIb):

sentido: $5' n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3'$
antisentido: $3' n_p-N_a-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'-n_q' 5'$ (IIIb)

en la que cada N_b y N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 1-5 nucleótidos modificados.

En otra implementación más, la fórmula (III) se representa por la fórmula (IIIc):

sentido: $5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q 3'$
antisentido: $3' n_p-N_a-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q' 5'$ (IIIc)

- 25 en la que cada N_b y N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 1-5 nucleótidos modificados.

En una implementación más, la fórmula (III) se representa por la fórmula (IIId):

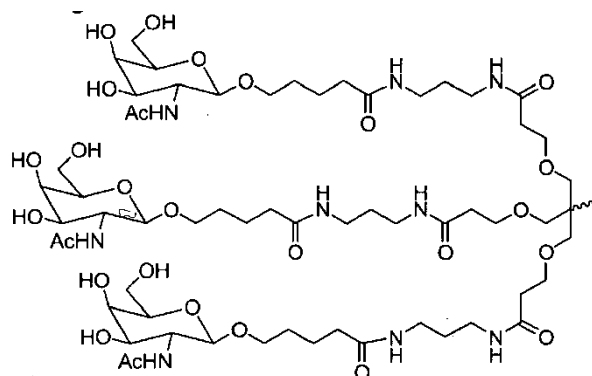
sentido: $5' n_p-N_a-XXX-N_b-Y YY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3'$
antisentido: $3' n_p-N_a-X'X'X'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-Z'Z'Z'-N_a'-n_q' 5'$ (IIId)

en la que cada N_b y N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 1-5 nucleótidos modificados y cada N_a y N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-10 nucleótidos modificados.

- 30 En una implementación, la región bicatenaria tiene 15-30 pares de nucleótidos de longitud. En otra implementación, la región bicatenaria tiene 17-23 pares de nucleótidos de longitud. En otra implementación más, la región bicatenaria tiene 17-25 pares de nucleótidos de longitud. En una implementación, la región bicatenaria tiene 23-27 pares de nucleótidos de longitud. En otra implementación, la región bicatenaria tiene 19-21 pares de nucleótidos de longitud. En otra implementación, la región bicatenaria tiene 21-23 pares de nucleótidos de longitud. En una implementación, cada hebra tiene 15-30 nucleótidos. En otra realización, cada hebra tiene 19-30 nucleótidos.
- 35

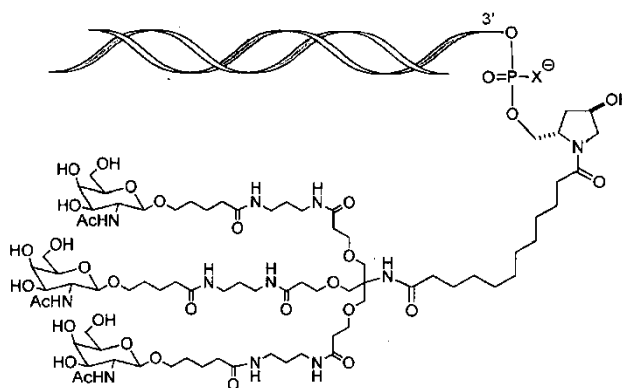
En una implementación, las modificaciones en los nucleótidos están seleccionadas del grupo que consiste en LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-alquilo, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-flúor, 2'-desoxi, 2'-hidroxilo y combinaciones de los mismos. En otra implementación, las modificaciones en los nucleótidos son modificaciones 2'-O-metilo o 2'-flúor.

En una implementación, el ligando es uno o más derivados de GalNAc unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente. En otra realización, el ligando es



En una implementación, el ligando está unido al extremo 3' de la hebra codificante.

En una implementación, el agente de iARN está conjugado con el ligando como se muestra en el siguiente esquema



10 en el que X es O o S. En una implementación específica, X es O.

En una implementación, el agente comprende además al menos un enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato.

En una implementación, el enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato está en el extremo 3' de una hebra.

15 En una implementación, la hebra es la hebra no codificante. En otra implementación, la hebra es la hebra codificante.

En una implementación, el enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato está en el extremo 5' de una hebra.

En una implementación, la hebra es la hebra no codificante. En otra realización, la hebra es la hebra codificante.

En una implementación, el enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato está en tanto el extremo 5' como el extremo 3' de una hebra. En una implementación, la hebra es la hebra no codificante.

20 En una implementación, el agente de iARN comprende 6-8 enlaces internucleotídicos fosforotioato. En una implementación, la hebra no codificante comprende dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5' y dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 3', y la hebra codificante comprende al menos dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en cualquiera del extremo 5' o el extremo 3'.

25 En una implementación, el par de bases en la posición 1 del extremo 5' de la hebra no codificante del dúplex es un par de bases AU.

En una implementación, los nucleótidos Y contienen una modificación de 2'-flúor.

En una implementación, los nucleótidos Y' contienen una modificación de 2'-O-metilo.

En una implementación, $p > 0$. En otra implementación, $p = 2$.

En una implementación, $q'=0$, $p=0$, $q=0$ y p' nucleótidos protuberantes son complementarios al ARNm diana. En otra implementación, $q'=0$, $p=0$, $q=0$ y p' nucleótidos protuberantes son no complementarios al ARNm diana.

En una implementación, la hebra codificante tiene un total de 21 nucleótidos y la hebra no codificante tiene un total de 23 nucleótidos.

- 5 En una implementación, al menos un n_p' está ligado a un nucleótido vecino mediante un enlace fosforotioato.

En una implementación, todos los n_p' están ligados a nucleótidos vecinos mediante enlaces fosforotioato.

En una implementación, el agente de iARN está seleccionado del grupo de agentes de iARN enumerados en una cualquiera de las Tablas 1, 2, 5, 7, 8 y 9.

- 10 En una implementación, el agente de iARN está seleccionado del grupo que consiste en AD-58681, AD-59054, AD-61719 y AD-61444.

- En otro aspecto, la presente invención proporciona un agente de iARN bicatenario para inhibir la expresión de Serpina1 en una célula, en el que el agente de iARN bicatenario comprende una hebra codificante y una hebra no codificante que forman una región bicatenaria, en el que la hebra codificante comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 11, y la hebra no codificante comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, o SEQ ID NO: 25, en el que sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra codificante comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación de 2'-O-metilo y una modificación de 2'-flúor, en el que la hebra codificante comprende dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5', en el que sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra no codificante comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación de 2'-O-metilo y una modificación de 2'-flúor, en el que la hebra no codificante comprende dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5' y dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 3', en el que la hebra codificante está conjugada con uno o más derivados de GalNAc unidos mediante un conector bivalente o trivalente ramificado en el extremo 3', y en el que "sustancialmente todos" de los nucleótidos que están modificados significa que no más de 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos están sin modificar.

- 30 En una realización, una de las 3 diferencias de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la hebra no codificante es un desapareamiento de nucleótido en la región semilla de la hebra no codificante. En una realización, la hebra no codificante comprende una base universal en el nucleótido desapareado.

En una realización, todos los nucleótidos de dicha hebra codificante y todos los nucleótidos de dicha hebra no codificante comprenden una modificación.

- 35 En otro aspecto, la presente invención proporciona agentes de iARN, por ejemplo, agentes de iARN bicatenario, que pueden inhibir la expresión de Serpina1 en una célula, en los que el agente de iARN bicatenario comprende una hebra codificante sustancialmente complementaria a una hebra no codificante, en los que la hebra no codificante comprende una región sustancialmente complementaria a parte de un ARNm que codifica Serpina1, en los que cada hebra tiene aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, en los que el agente de iARN bicatenario se representa por la fórmula (III):

sentido: $5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3'$
 antisentido: $3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-YY'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q' 5'$ (III)

- 40 en la que:

i, j, k y l son cada uno independientemente 0 o 1;

p, p', q y q' son cada uno independientemente 0-6;

- 45 cada N_a y N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos que están tanto modificados como sin modificar o combinaciones de los mismos, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

cada N_b y N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos que están tanto modificados como sin modificar o combinaciones de los mismos;

cada n_p, n_p', n_q y n_q' , cada uno de los cuales puede o puede no estar presente, representa independientemente un nucleótido protuberante;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' y Z'Z'Z' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y en los que las modificaciones son modificaciones 2'-O-metilo o 2'-flúor;

5 modificaciones en N_b se diferencian de la modificación en Y y modificaciones en N_b' se diferencian de la modificación en Y'; y

en los que la hebra codificante está conjugada con al menos un ligando.

10 En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona agentes de iARN, por ejemplo, agentes de iARN bicatenario, que pueden inhibir la expresión de Serpina1 en una célula, en los que el agente de iARN bicatenario comprende una hebra codificante sustancialmente complementaria a una hebra no codificante, en los que la hebra no codificante comprende una región sustancialmente complementaria a parte de un ARNm que codifica Serpina1, en los que cada hebra tiene aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, en los que el agente de iARN bicatenario se representa por la fórmula (III):

sentido: $5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3'$

antisentido: $3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q' 5'$ (III)

en la que:

i, j, k y l son cada uno independientemente 0 o 1;

15 cada n_p , n_q y n_q' , cada uno de los cuales puede o puede no estar presente, representa independientemente un nucleótido protuberante;

p, q y q' son cada uno independientemente 0-6;

$n_p' > 0$ y al menos un n_p' está ligado a un nucleótido vecino mediante un enlace fosforotioato;

20 cada N_a y N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos que están tanto modificados como sin modificar o combinaciones de los mismos, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

cada N_b y N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos que están tanto modificados como sin modificar o combinaciones de los mismos;

25 XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' y Z'Z'Z' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y en los que las modificaciones son modificaciones 2'-O-metilo o 2'-flúor;

modificaciones en N_b se diferencian de la modificación en Y y modificaciones en N_b' se diferencian de la modificación en Y'; y

en los que la hebra codificante está conjugada con al menos un ligando.

30 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona agentes de iARN, por ejemplo, agentes de iARN bicatenario, que pueden inhibir la expresión de Serpina1 en una célula, en los que el agente de iARN bicatenario comprende una hebra codificante sustancialmente complementaria a una hebra no codificante, en los que la hebra no codificante comprende una región sustancialmente complementaria a parte de un ARNm que codifica Serpina1, en los que cada hebra tiene aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, en los que el agente de iARN bicatenario se representa por la fórmula (III):

sentido: $5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3'$

antisentido: $3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q' 5'$ (III)

en la que:

i, j, k y l son cada uno independientemente 0 o 1;

35 cada n_p , n_q y n_q' , cada uno de los cuales puede o puede no estar presente, representa independientemente un nucleótido protuberante;

40 p, q y q' son cada uno independientemente 0-6;

$n_p' > 0$ y al menos un n_p' está ligado a un nucleótido vecino mediante un enlace fosforotioato;

cada N_a y N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos que están tanto modificados como sin modificar o combinaciones de los mismos, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

5 cada N_b y N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos que están tanto modificados como sin modificar o combinaciones de los mismos;

XXX, YYY, ZZZ, $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ y $Z'Z'Z'$ representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y en los que las modificaciones son modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-flúor;

10 modificaciones en N_b se diferencian de la modificación en Y y modificaciones en N_b' se diferencian de la modificación en Y'; y

en los que la hebra codificante está conjugada con al menos un ligando, en la que el ligando es uno o más derivados de GalNAc unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente.

15 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona agentes de iARN, por ejemplo, agentes de iARN bicatenario que pueden inhibir la expresión de Serpina1 en una célula, en los que el agente de iARN bicatenario comprende una hebra codificante sustancialmente complementaria a una hebra no codificante, en los que la hebra no codificante comprende una región sustancialmente complementaria a parte de un ARNm que codifica Serpina1, en los que cada hebra tiene aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, en los que el agente de iARN bicatenario se representa por la fórmula (III):

sentido: $5' n_p - N_a - (X XX)_i - N_b - Y YY - N_b' - (Z ZZ)_j - N_a' - n_q, 3'$
 antisentido: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b - (Z'Z'Z')_l - N_a - n_q' 5'$ (III)

en la que:

20 i, j, k y l son cada uno independientemente 0 o 1;

cada n_p , n_q y n_q' , cada uno de los cuales puede o puede no estar presente, representa independientemente un nucleótido protuberante;

p, q y q' son cada uno independientemente 0-6;

$n_p' > 0$ y al menos un n_p' está ligado a un nucleótido vecino mediante un enlace fosforotioato;

25 cada N_a y N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos que están tanto modificados como sin modificar o combinaciones de los mismos, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

cada N_b y N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos que están tanto modificados como sin modificar o combinaciones de los mismos;

30 XXX, YYY, ZZZ, $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ y $Z'Z'Z'$ representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y en los que las modificaciones son modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-flúor;

modificaciones en N_b se diferencian de la modificación en Y y modificaciones en N_b' se diferencian de la modificación en Y';

35 en los que la hebra codificante comprende al menos un enlace fosforotioato; y

en los que la hebra codificante está conjugada con al menos un ligando, en la que el ligando es uno o más derivados de GalNAc unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente.

40 En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona agentes de iARN, por ejemplo, agentes de iARN bicatenario, que pueden inhibir la expresión de Serpina1 en una célula, en los que el agente de iARN bicatenario comprende una hebra codificante sustancialmente complementaria a una hebra no codificante, en los que la hebra no codificante comprende una región sustancialmente complementaria a parte de un ARNm que codifica Serpina1, en los que cada hebra tiene aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, en los que el agente de iARN bicatenario se representa por la fórmula (IIIa):

sentido: $5' n_p - N_a - YYY - N_a' - n_q 3'$
 antisentido: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a - n_q' 5'$ (IIIa)

en la que:

cada n_p , n_q y $n_{q'}$, cada uno de los cuales puede o puede no estar presente, representa independientemente un nucleótido protuberante;

p , q y q' son cada uno independientemente 0-6;

$n_p' > 0$ y al menos un n_p' está ligado a un nucleótido vecino mediante un enlace fosforotioato;

- 5 cada N_a y N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos que están tanto modificados como sin modificar o combinaciones de los mismos, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

YYY e Y'Y'Y' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y en los que las modificaciones son modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-flúor;

- 10 en los que la hebra codificante comprende al menos un enlace fosforotioato; y

en los que la hebra codificante está conjugada con al menos un ligando, en la que el ligando es uno o más derivados de GalNAc unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente.

- 15 En una implementación, N_a' comprende 1-25 nucleótidos, y en la que uno de las 1-25 nucleótidos en una de las posiciones 2-9 del extremo 5' es un desapareamiento de nucleótido. En una realización, la base desapareada es una base universal.

La presente divulgación también proporciona células, vectores, células huésped y composiciones farmacéuticas que comprenden los agentes de iARN bicatenario de la invención.

La presente divulgación proporciona agente de iARN seleccionado del grupo de agentes de iARN enumerado en una cualquiera de las Tablas 1, 2, 5, 7, 8 y 9.

- 20 La presente divulgación también proporciona una composición que comprende un agente antisentido de polinucleótido modificado. El agente es capaz de inhibir la expresión de *Serpina1* en una célula, y comprende una secuencia complementaria a una secuencia sentido seleccionada del grupo de las secuencias enumeradas en una cualquiera de las Tablas 1, 2, 5, 7, 8 y 9, en la que el polinucleótido tiene aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud.

- 25 En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula *in vitro* que contiene el agente de iARN bicatenario de la invención.

En algunas implementaciones, el agente de iARN se administra usando una composición farmacéutica.

- 30 En implementaciones preferidas, el agente de iARN se administra en una disolución. En algunas de tales implementaciones, el ARNip se administra en una disolución no tamponada. En una implementación, el ARNip se administra en agua. En otras implementaciones, el ARNip se administra con una disolución de tampón, tal como un tampón acetato, un tampón citrato, un tampón prolamina, un tampón carbonato, o un tampón fosfato o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la disolución de tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

- 35 En una implementación, las composiciones farmacéuticas comprenden además una formulación de lípido. En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para inhibir la expresión de *Serpina1* en una célula. Los métodos incluyen poner en contacto la célula con un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN bicatenario, composición, vector, o una composición farmacéutica de la invención; y mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm de un gen *Serpina1*, inhibiendo así la expresión del gen *Serpina1* en la célula.

- 40 En una implementación, la célula está dentro de un sujeto.

En una implementación, el sujeto es un ser humano.

En una implementación, la expresión de *Serpina1* se inhibe al menos aproximadamente el 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %.

- 45 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad asociada a *Serpina1*. Los métodos incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN bicatenario, composición, vector, o una composición farmacéutica de la invención, tratándose así el sujeto.

- 50 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno asociado a *Serpina1*. Los métodos incluyen administrar por vía subcutánea al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de iARN bicatenario, en el que el agente de iARN bicatenario comprende una hebra codificante

- y una hebra no codificante que forman una región bicatenaria, en el que la hebra codificante comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 11, y la hebra no codificante comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, o SEQ ID NO: 25, en el que sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra no codificante comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación de 2'-O-metilo y una modificación de 2'-flúor, en el que la hebra no codificante comprende dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5' y dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 3', en el que sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra codificante comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación de 2'-O-metilo y una modificación de 2'-flúor, en el que la hebra codificante comprende dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5' y, en el que la hebra codificante está conjugada con uno o más derivados de GalNAc unidos mediante un conector bivalente o trivalente ramificado en el extremo 3', tratándose así el sujeto.
- En una implementación, una de las 3 diferencias de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la hebra no codificante es un desapareamiento de nucleótido en la región semilla de la hebra no codificante. En una implementación, la hebra no codificante comprende una base universal en el nucleótido desapareado.
- En una implementación, todos los nucleótidos de la hebra codificante y todos los nucleótidos de la hebra no codificante comprenden una modificación.
- En una implementación, la enfermedad asociada a *Serpina1* es un trastorno del hígado, por ejemplo, enfermedad hepática crónica, inflamación del hígado, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular
- En una implementación, la administración del agente de iARN al sujeto produce una disminución en la cirrosis hepática, fibrosis y/o acumulación de proteína *Serpina1* en el hígado. En otra realización, la administración del agente de iARN al sujeto produce, por ejemplo, produce además, una disminución en la inflamación pulmonar.
- En una implementación, el sujeto es un ser humano.
- En una implementación, el agente de iARN, por ejemplo, el agente de iARN bicatenario, se administra a una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, o aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg.
- En una implementación, el agente de iARN, por ejemplo, el agente de iARN bicatenario, se administra vía subcutánea o por vía intravenosa.
- En todavía otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos de inhibición del desarrollo de carcinoma hepatocelular en un sujeto que tiene una variante de deficiencia de *Serpina1*. Los métodos incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN bicatenario, composición, vector o una composición farmacéutica de la invención, inhibiéndose así el desarrollo de carcinoma hepatocelular en el sujeto.
- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos de inhibición del desarrollo de carcinoma hepatocelular en un sujeto que tiene una variante de deficiencia de *Serpina1*. Los métodos incluyen administrar por vía subcutánea al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de iARN bicatenario, en el que el agente de iARN bicatenario comprende una hebra codificante y una hebra no codificante que forman una región bicatenaria, en el que la hebra codificante comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 11, y la hebra no codificante comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, o SEQ ID NO: 25, en el que sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra no codificante comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación de 2'-O-metilo y una modificación de 2'-flúor, en el que la hebra no codificante comprende dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5' y dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 3', en el que sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra codificante comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación de 2'-O-metilo y una modificación de 2'-flúor, en el que la hebra codificante comprende dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5' y, en el que la hebra codificante está conjugada con uno o más derivados de GalNAc unidos mediante un conector bivalente o trivalente ramificado en el

extremo 3', inhibiéndose así el desarrollo de carcinoma hepatocelular en el sujeto que tiene una variante de deficiencia de Serpina1.

En una implementación, una de las 3 diferencias de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la hebra no codificante es un desapareamiento de nucleótido en la región semilla de la hebra no codificante. En una implementación, la hebra no codificante comprende una base universal en el nucleótido desapareado.

En una implementación, todos los nucleótidos de la hebra codificante y todos los nucleótidos de la hebra no codificante comprenden una modificación.

En una implementación, el sujeto es un primate o roedor. En otra implementación, el sujeto es un ser humano.

En una implementación, el agente de iARN, por ejemplo, el agente de iARN bicatenario, se administra a una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. En otra implementación, el agente de iARN bicatenario se administra a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg.

En una implementación, el agente de iARN, por ejemplo, el agente de iARN bicatenario, se administra a una dosis de aproximadamente 3 mg/kg. En otra implementación, el agente de iARN bicatenario se administra a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg. En otra implementación más, el agente de iARN bicatenario se administra a una dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg dos veces por semana. En otra implementación más, el agente de iARN bicatenario se administra a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg cada dos semanas. En otra implementación más, el agente de iARN bicatenario se administra a una dosis de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 mg/kg una vez por semana.

En una implementación, el agente de iARN, por ejemplo, el agente de iARN bicatenario, se administra dos veces por semana. En otra implementación, el agente de iARN se administra cada dos semanas.

En una implementación, el agente de iARN, por ejemplo, el agente de iARN bicatenario, se administra vía subcutánea o por vía intravenosa.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos de reducción de la acumulación de Serpina1 erróneamente plegada en el hígado de un sujeto que tiene una variante de deficiencia de Serpina1. Los métodos incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN bicatenario, composición, vector, o una composición farmacéutica de la invención, reduciéndose así la acumulación de Serpina1 erróneamente plegada en el hígado del sujeto.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos de reducción de la acumulación de Serpina1 erróneamente plegada en el hígado de un sujeto que tiene una variante de deficiencia de Serpina1. Los métodos incluyen administrar por vía subcutánea al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de iARN bicatenario, en el que el agente de iARN bicatenario comprende una hebra codificante y una hebra no codificante que forman una región bicatenaria, en el que la hebra codificante comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 11, y la hebra no codificante comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, o SEQ ID NO: 25, en el que sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra no codificante comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación de 2'-O-metilo y una modificación de 2'-flúor, en el que la hebra no codificante comprende dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5' y dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 3', en el que sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra codificante comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación de 2'-O-metilo y una modificación de 2'-flúor, en el que la hebra codificante comprende dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5' y, en el que la hebra codificante está conjugada con uno o más derivados de GalNAc unidos mediante un conector bivalente o trivalente ramificado en el extremo 3', reduciéndose así la acumulación de Serpina1 erróneamente plegada en el hígado del sujeto que tiene una variante de deficiencia de Serpina1.

En una implementación, una de las 3 diferencias de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la hebra no codificante es un desapareamiento de nucleótido en la región semilla de la hebra no codificante. En una implementación, la hebra no codificante comprende una base universal en el nucleótido desapareado.

En una implementación, todos los nucleótidos de la hebra codificante y todos los nucleótidos de la hebra no codificante comprenden una modificación.

En una implementación, el sujeto es un primate o roedor. En otra implementación, el sujeto es un ser humano.

En una implementación, el agente de iARN, por ejemplo, el agente de iARN bicatenario, se administra a una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. En otra implementación, el agente de iARN bicatenario se administra a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg.

- 5 En una implementación, el agente de iARN, por ejemplo, el agente de iARN bicatenario, se administra por vía subcutánea o por vía intravenosa.

La Figura 1 es un gráfico que representa la eficacia *in vivo* y duración de la respuesta para los ARNip indicados en ratones transgénicos que expresan la forma Z-AAT de AAT humana.

- 10 Las Figuras 2A-2B representan la eficacia *in vivo* de cinco ARNip con valores de CI50 bajos. Se inyectaron ratones transgénicos que expresan el alelo Z-AAT humana con 10 mg/kg de dúplex de ARNip en el día 0 y se siguió AAT humana en suero durante 21 días después de la dosis (Figura 2A). Cada punto representa un promedio de tres ratones y las barras de error reflejan la desviación estándar. La Figura 2B representa niveles de ARNm de hAAT en hígado normalizados a GAPDH para cada grupo. Las barras reflejan el promedio y las barras de error reflejan la desviación estándar.

- 15 Las Figuras 3A-3C representan la supresión de AAT duradera de una manera sensible a la dosis. La Figura 3A representa específicamente la curva de eficacia que muestra la inactivación máxima de niveles de proteína hAAT en suero alcanzados a diferentes dosis de AD-59054 administrado por vía subcutánea a ratones transgénicos. Cada punto es un promedio de tres animales y las barras de error representan la desviación estándar. La duración de la inactivación después de una dosis única de ARNip de AAT a 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg se muestra en la Figura 3B. Los niveles de hAAT se normalizaron al promedio de tres sangrados previos para cada animal. El grupo de PBS sirve de control para reflejar la variabilidad en los niveles de hAAT en suero. Cada punto de datos es un promedio de tres animales y las barras de error reflejan la desviación estándar. En la Figura 3C, los animales se administraron con AD-59054 a una dosis de 0,5 mg/kg dos veces a la semana. Cada punto de datos es un promedio con respecto a hAAT de suero de cuatro animales y las barras de error reflejan la desviación estándar.

- 25 Las Figuras 4A-4D representan la disminución de la incidencia de tumor con reducción en Z-AAT. La Figura 4A representa el diseño del estudio por el cual ratones envejecidos con hígados fibróticos se administraron por vía subcutánea una vez cada dos semanas (Q2W) con PBS o 10 mg/kg de dúplex de ARNip AD58681 durante 11 dosis y se sacrificaron 7 días después de la última dosis. La Figura 4B muestra los niveles de ARNm de hAAT en hígado en grupos de control y tratados. La Figura 4C muestra los niveles en hígado de ARNm de Col1a2 en grupos de control y tratados. La Figura 4D representa los niveles en hígado de ARNm de PtPrc en grupos de control y tratados.

- 35 Las Figuras 5A-5C representan la disminución de la incidencia de tumor con reducción en Z-AAT. Se recogieron muestras de suero de ratones tratados según el diseño del estudio de la Figura 4A para monitorizar el grado de supresión de hAAT. La Figura 5A representa niveles de proteína hAAT en suero después de la primera dosis. La Figura 5B y Figura 5C representan tinción con PAS de secciones de hígado de dos compañeros de camada tratados con ya sea PBS o ARNip de AAT. Los puntos de color más oscuro representan los glóbulos o agregados de Z-AAT.

La Figura 6 representa la eficacia *in vivo* de los compuestos indicados.

Las Figuras 7A y 7B son gráficos que representa la duración de la inactivación de AAT en primates no humanos después de una dosis única de AD-59054, AD-61719, o AD-61444 a una dosis de 1 mg/kg (7A) o 3 mg/kg (7B). Cada punto de datos es un promedio de tres animales y las barras de error reflejan la desviación estándar.

- 40 La Figura 8A muestra la secuencia de nucleótidos de Serpina1 de *Homo sapiens*, variante de transcrito 1 (SEQ ID NO: 1); la Figura 8B muestra la secuencia de nucleótidos de Serpina1 de *Homo sapiens*, variante de transcrito 3 (SEQ ID NO: 2); la Figura 8C muestra la secuencia de nucleótidos de Serpina1 de *Homo sapiens*, variante de transcrito 2 (SEQ ID NO: 3); la Figura 8D muestra la secuencia de nucleótidos de Serpina1 de *Homo sapiens*, variante de transcrito 4 (SEQ ID NO: 4); la Figura 8E muestra la secuencia de nucleótidos de Serpina1 de *Homo sapiens*, variante de transcrito 5 (SEQ ID NO: 5); la Figura 8F muestra la secuencia de nucleótidos de Serpina1 de *Homo sapiens*, variante de transcrito 6 (SEQ ID NO: 6); la Figura 8G muestra la secuencia de nucleótidos de Serpina1 de *Homo sapiens*, variante de transcrito 7 (SEQ ID NO: 7); la Figura 8H muestra la secuencia de nucleótidos de Serpina1 de *Homo sapiens*, variante de transcrito 8 (SEQ ID NO: 8); la Figura 8I muestra la secuencia de nucleótidos de Serpina1 de *Homo sapiens*, variante de transcrito 9 (SEQ ID NO: 9); la Figura 8J muestra la secuencia de nucleótidos de Serpina1 de *Homo sapiens*, variante de transcrito 10 (SEQ ID NO: 10); la Figura 8K muestra la secuencia de nucleótidos de Serpina1 de *Homo sapiens*, variante de transcrito 11 (SEQ ID NO: 11); la Figura 8L muestra la secuencia de nucleótidos de Serpina1 de *Macaca mulatta* (SEQ ID NO: 12); la Figura 8M muestra la secuencia de nucleótidos de Serpina1 de *Macaca mulatta*, variante de transcrito 6 (SEQ ID NO: 13); la Figura 8N muestra la secuencia de nucleótidos de Serpina1 de *Macaca mulatta*, variante de transcrito 4 (SEQ ID NO: 14); la Figura 8O muestra el complemento inverso de SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 15); la Figura 8P muestra el complemento inverso de SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 16); la Figura 8Q muestra el complemento inverso de SEQ ID NO: 3 (SEQ ID NO: 17); la Figura 8R muestra el complemento inverso de SEQ ID NO: 4 (SEQ ID NO: 18); la Figura 8S muestra el complemento inverso de SEQ ID NO: 5

(SEQ ID NO: 19); la Figura 8T muestra el complemento inverso de SEQ ID NO: 6 (SEQ ID NO: 20); la Figura 8U muestra el complemento inverso de SEQ ID NO: 7 (SEQ ID NO: 21); la Figura 8V muestra el complemento inverso de SEQ ID NO: 8 (SEQ ID NO: 22); la Figura 8W muestra el complemento inverso de SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 23); la Figura 8X muestra el complemento inverso de SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO: 24); la Figura 8Y muestra el complemento inverso de SEQ ID NO: 11 (SEQ ID NO: 25); la Figura 8Z muestra el complemento inverso de SEQ ID NO: 12 (SEQ ID NO: 26); la Figura 8AA muestra el complemento inverso de SEQ ID NO: 13 (SEQ ID NO: 27); y Figura 8AB muestra el complemento inverso de SEQ ID NO: 14 (SEQ ID NO: 28).

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden agentes, por ejemplo, oligonucleótidos monocatenarios y bicatenarios, por ejemplo, agentes de iARN, por ejemplo, agentes de ARNi bicatenario, que se dirigen a Serpina1. También se desvelan métodos de uso de las composiciones de la invención para inhibir la expresión de Serpina1 y para tratar enfermedades asociadas a Serpina1, tales como trastornos del hígado, por ejemplo, enfermedad hepática crónica, inflamación del hígado, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular.

I. Definiciones

Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, ciertos términos se definen primero. Además, debe observarse que siempre que se cite un valor o intervalo de valores de un parámetro, se pretende que valores e intervalos intermedios a los valores citados también sean parte de la presente invención.

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento, por ejemplo, una pluralidad de elementos.

El término "que incluye" se usa en el presente documento para significar, y se usa indistintamente con, la expresión "que incluye, pero no se limita a".

El término "o" se usa en el presente para significar, y se usa indistintamente con, el término "y/o", a menos que el contexto indique claramente de otro modo.

Como se usa en el presente documento, "Serpina1" se refiere al inhibidor de serpina peptidasa, clado A, gen o proteína de miembro 1. Serpina1 también se conoce como alfa-1-antitripsina, α -1-antitripsina, AAT, inhibidor de la proteasa 1, PI, PI1, antielastasa y antitripsina.

El término Serpina1 incluye Serpina1 humana, cuya secuencia de aminoácidos y de nucleótidos puede encontrarse en, por ejemplo, N.º de acceso de GenBank GI:189163524 (SEQ ID NO: 1), GI:189163525 (SEQ ID NO: 2), GI:189163526 (SEQ ID NO: 3), GI:189163527 (SEQ ID NO: 4), GI:189163529 (SEQ ID NO: 5), GI:189163531 (SEQ ID NO: 6), GI:189163533 (SEQ ID NO: 7), GI:189163535 (SEQ ID NO: 8), GI:189163537 (SEQ ID NO: 9), GI:189163539 (SEQ ID NO: 10), y/o GI:189163541 (SEQ ID NO: 11); Serpina1 de rhesus, cuya secuencia de aminoácidos y de nucleótidos puede encontrarse en, por ejemplo, N.º de acceso de GenBank GI:402766667 (SEQ ID NO: 12), GI:297298519 (SEQ ID NO: 13) y/o GI:297298520 (SEQ ID NO: 14); Serpina1 de ratón, cuya secuencia de aminoácidos y de nucleótidos puede encontrarse en, por ejemplo, N.º de acceso de GenBank GI:357588423 y/o GI:357588426; y rata, cuya secuencia de aminoácidos y de nucleótidos puede encontrarse en, por ejemplo, N.º de acceso de GenBank GI:77020249. Ejemplos adicionales de secuencias de ARNm de Serpina1 están fácilmente disponibles usando, por ejemplo, GenBank y OMIM.

Se han identificado más de 120 alelos de Serpina1 y los alelos "M" se consideran el alelo no mutante o "normal" (por ejemplo, "PIM1-ALA213" (también conocido como PI, M1A), "PIM1-VAL213" (también conocido como PI, M1V), "PIM2", "PIM3" y "PIM4"). Pueden encontrarse variantes adicionales en, por ejemplo, la base de datos A(1)ATVar (véase, por ejemplo, Zaimidou, S., et al. (2009) Hum Mutat. 230(3):308-13 y www.goldenhelix.org/A1ATVar).

Como se usa en el presente documento, el término "alelo de deficiencia de Serpina1" se refiere a un alelo de variante que produce proteínas que no se pliegan apropiadamente y pueden agregarse intracelularmente y, así, no son apropiadamente transportadas del sitio de síntesis en el hígado al sitio de acción dentro del cuerpo.

Alelos de deficiencia de Serpina1 a modo de ejemplo incluyen, el "alelo Z", el "alelo S", el "alelo PIM(Malton)" y el "alelo PIM(Procida)".

Como se usa en el presente documento, los términos "alelo Z", "PIZ" y "Z-AAT" se refieren a un alelo de variante de Serpina1 en el que el aminoácido en la posición 342 de la proteína cambia de una glutamina a una lisina como resultado del codón relevante que cambia de GAG a AAG. Un sujeto homocigótico para un alelo Z puede denominarse "PIZZ". Mutaciones Z-AAT representan el 95 % de los pacientes con deficiencia de Serpina1 y se estima que está presente en 100.000 estadounidenses y aproximadamente 3 millones de individuos en el mundo. El alelo Z alcanza frecuencias polimórficas en caucásicos y es raro o está ausente en asiáticos y negros. El fenotipo ZZ homocigótico está asociado a un alto riesgo de tanto enfisema como enfermedad hepática. La proteína Z-AAT no se pliega correctamente en el retículo endoplásmico, conduciendo a polímeros de hoja en bucle que se agregan y

reducen la secreción, provocación de la respuesta de la proteína no plegada, apoptosis, respuesta de sobrecarga del retículo endoplásmico, autofagia, estrés mitocondrial y función de hepatocitos alterada.

Como se usa en el presente documento, los términos "PIM(Malton)" y "M(Malton)-AAT" se refieren a un alelo de variante de Serpina1 en el que uno de los restos de fenilalanina adyacentes en la posición 51 o 52 de la proteína madura está deletado. La delección de este aminoácido acorta una hebra de la hoja beta, B6, previniendo el procesamiento normal y secreción en el hígado que está asociado a inclusiones de hepatocitos y secreción alterada de la proteína del hígado.

Como se usa en el presente documento, el término "PIS" se refiere a un alelo de variante de Serpina1 en el que un ácido glutámico en la posición 264 está sustituido con valina. Aunque la mayor parte de esta proteína de variante es degradada intracelularmente, hay una alta frecuencia de alelo PIS en la población caucásica y, así, son frecuentes los heterocigotos compuestos con un alelo Z o nulo.

Como se usa en el presente documento, "secuencia diana" se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen Serpina1, que incluye ARNm que es un producto del procesamiento de ARN de un producto de transcripción primario.

Como se usa en el presente documento, el término "hebra que comprende una secuencia" se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que se describe por la secuencia citada usando la nomenclatura de nucleótidos estándar.

"G", "C", "A" y "U" representan cada uno generalmente un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina y uracilo como base, respectivamente. "T" y "dT" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un desoxirribonucleótido en el que la nucleobase es timina, por ejemplo, desoxirribotimina, 2'-desoxitimidina o timidina. Sin embargo, se entenderá que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" o "desoxirribonucleótido" también pueden referirse a un nucleótido modificado, como se detalla adicionalmente más adelante, o un resto de sustitución sustituto. El experto sabe bien que la guanina, citosina, adenina y uracilo pueden sustituirse con otros restos sin alterar sustancialmente las propiedades de apareamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que lleva tal resto de sustitución. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que comprende inosina como su base puede emparejar bases con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. Por tanto, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina pueden sustituirse en las secuencias de nucleótidos de la invención con un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. Secuencias que comprenden tales restos de sustitución son realizaciones de la invención. Los términos "ARNi", "agente de iARN", "agente de ARNi", "agente de interferencia de ARN", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a un agente que contiene ARN como tal término se define en el presente documento, y que media en la escisión dirigida de un transcrito de ARN mediante una ruta del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). El ARNi dirige la degradación específica de secuencia del ARNm mediante un proceso conocido como interferencia por ARN (iARN). El ARNi modula, por ejemplo, inhibe, la expresión de Serpina1 en una célula, por ejemplo, una célula dentro de un sujeto, tal como un sujeto mamífero.

En una implementación, un agente de iARN de la divulgación incluye un ARN monocatenario que interacciona con una secuencia de ARN diana, por ejemplo, una secuencia de ARNm diana de Serpina1, para dirigir la escisión del ARN diana. Sin desear ceñirse a teoría alguna, se cree que el ARN bicatenario largo introducido en células se rompe en ARNip por una endonucleasa de tipo III conocida como Dicer (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Dicer, una enzima similar a ribonucleasa-III, procesa el ARNbc en ARN interferentes pequeños de 19-23 pares de bases con nucleótidos protuberantes de 3' de dos bases característicos (Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363). Entonces, los ARNip se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) en el que una o más helicasas desenrollan el dúplex de ARNip, permitiendo que la hebra no codificante complementaria guíe el reconocimiento de diana (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309). Tras la unión al ARNm diana apropiado, una o más endonucleasas dentro del RISC escinden la diana para inducir el silenciamiento (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188). Así, en un aspecto, la invención se refiere a un ARN monocatenario (ARNip) generado dentro de una célula y que promueve la formación de un complejo RISC para efectuar el silenciamiento del gen diana, es decir, un gen Serpina1. Por consiguiente, el término "ARNip" también se usa en el presente documento para referirse a una iARN como se ha descrito anteriormente.

En otra implementación, el agente de iARN puede ser un ARNip monocatenario que se introduce en una célula u organismo para inhibir un ARNm diana. Los agentes de iARN monocatenarios se unen a la endonucleasa del RISC Argonaute 2, que entonces escinde el ARNm diana. Los ARNip monocatenarios tienen generalmente 15-30 nucleótidos y están químicamente modificados. El diseño y prueba de ARNip monocatenarios se describen en la patente de EE.UU. N.º 8.101.348 y en Lima et al., (2012) Cell 150: 883-894, cuyos contenidos enteros de cada uno se incorporan por este documento en el presente documento por referencia. Cualquiera de las secuencias de nucleótidos antisentido descritas en el presente documento puede usarse como ARNip monocatenario como se describe en el presente documento o como químicamente modificado por los métodos descritos en Lima et al., (2012) Cell 150: 883-894.

En otra implementación más, la presente invención proporciona moléculas de oligonucleótido antisentido monocatenario que se dirigen a Serpina1. Una "molécula de oligonucleótido antisentido monocatenario" es complementaria a una secuencia dentro del ARNm diana (es decir, Serpina1). Las moléculas de oligonucleótido antisentido monocatenario pueden inhibir la traducción de una manera estequiométrica por apareamiento de bases con el ARNm y obstruyendo físicamente la maquinaria de traducción, véase Dias, N. et al., (2002) Mol Cancer Ther 1:347-355. Alternativamente, las moléculas de oligonucleótido antisentido monocatenario inhiben un ARNm diana hibridándose con la diana y escindiendo la diana mediante un evento de escisión de RNasaH. La molécula de oligonucleótido antisentido monocatenario puede tener aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud y tener una secuencia que es complementaria a una secuencia diana. Por ejemplo, la molécula de oligonucleótido antisentido monocatenario puede comprender una secuencia que tiene al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más nucleótidos contiguos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos antisentido descritas en el presente documento, por ejemplo, las secuencias proporcionadas en una cualquiera de las Tablas, 1, 2, 5, 7, 8 o 9, o unirse a cualquiera de los sitios diana descritos en el presente documento. Las moléculas de oligonucleótido antisentido monocatenario pueden comprender ARN, ADN modificados, o una combinación de ambos.

En otra implementación, un "ARNi" para su uso en las composiciones, usos y métodos de la invención es un ARN bicatenario y se denomina en el presente documento "el agente de iARN bicatenario", "molécula de ARN bicatenario (ARNbc)", "agente de ARNbc" o "ARNbc". El término "ARNbc" se refiere a un complejo de moléculas de ácidos ribonucleicos, que tiene una estructura de dúplex que comprende dos hebras de ácidos nucleicos antiparalelas y sustancialmente complementarias, que se denomina que tienen orientaciones "sentido" y "antisentido" con respecto a un ARN diana, es decir, un gen Serpina1. En algunas implementaciones de la invención, un ARN bicatenario (ARNbc) desencadena la degradación de un ARN diana, por ejemplo, un ARNm, mediante un mecanismo de silenciamiento de genes postranscripcional denominado en el presente documento interferencia por ARN o iARN.

En general, la mayoría de los nucleótidos de cada hebra de una molécula de ARNbc son ribonucleótidos, pero como se describe en detalle en el presente documento, cada una o ambas de las hebras también puede incluir uno o más no ribonucleótidos, por ejemplo, un desoxirribonucleótido y/o un nucleótido modificado. Además, como se usa en esta memoria descriptiva, un "agente de iARN" puede incluir ribonucleótidos con modificaciones químicas; un agente de iARN puede incluir modificaciones sustanciales en múltiples nucleótidos. Tales modificaciones pueden incluir todos los tipos de modificaciones desveladas en el presente documento o conocidas en la técnica. Cualquiera de tales modificaciones, como se usa en una molécula tipo ARNip, está englobada por "agente de iARN" para los fines de esta memoria descriptiva y reivindicaciones.

Las dos hebras que forman la estructura de dúplex pueden ser porciones diferentes de una molécula de ARN mayor, o pueden ser moléculas de ARN separadas. Si las dos hebras son parte de una molécula mayor y, por tanto, están conectadas por una cadena de nucleótidos sin interrumpir entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura de dúplex, la cadena de ARN de conexión se denomina un "bucle en horquilla". Si las dos hebras están conectadas covalentemente por medios distintos de una cadena de nucleótidos sin interrumpir entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura de dúplex, la estructura de conexión se denomina un "conector". Las hebras de ARN pueden tener el mismo número o un número diferente de nucleótidos. El máximo número de pares de bases es el número de nucleótidos en la hebra más corta del ARNbc menos cualquier nucleótido protuberante que esté presente en el dúplex. Además de la estructura de dúplex, un agente de iARN puede comprender uno o más nucleótidos protuberantes.

En una implementación, un agente de iARN de la invención es un ARNbc de 24-30 nucleótidos que interacciona con una secuencia de ARN diana, por ejemplo, una secuencia de ARNm diana de Serpina1, para dirigir la escisión del ARN diana. Sin desear ceñirse a teoría alguna, el ARN bicatenario largo introducido en células se rompe en ARNip por una endonucleasa de tipo III conocida como Dicer (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Dicer, una enzima similar a ribonucleasa-III, procesa el ARNbc en ARN interferentes pequeños de 19-23 pares de bases con nucleótidos protuberantes en 3' de dos bases característicos (Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363). Entonces, los ARNip se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) en el que una o más helicasas desenrollan el dúplex de ARNip, permitiendo que la hebra no codificante complementaria guíe el reconocimiento de diana (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309). Tras la unión al ARNm diana apropiado, una o más endonucleasas dentro del RISC escinden la diana para inducir el silenciamiento (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188). Como se usa en el presente documento, un "nucleótido protuberante" se refiere al nucleótido o nucleótidos sin aparear que sobresalen de la estructura de dúplex de un agente de iARN cuando un extremo 3' de una hebra del agente de iARN se extiende más allá del extremo 5' de la otra hebra, o viceversa. "Romo" o "extremo romo" significa que no hay nucleótidos no apareados en ese extremo del agente de iARN bicatenario, es decir, ningún nucleótido protuberante. Un agente de iARN "de extremos romos" es un ARNbc que es bicatenario en toda su longitud entera, es decir, ningún nucleótido protuberante en ningún extremo de la molécula. Los agentes de iARN de la invención incluyen agentes de iARN con nucleótidos protuberantes en un extremo (es decir, agentes con un nucleótido protuberante y un extremo romo) o con nucleótidos protuberantes en ambos extremos.

El término "hebra no codificante" se refiere a la hebra de un agente de iARN bicatenario que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia diana (por ejemplo, un ARNm de Serpina1 humana). Como se usa en el presente documento, el término "región complementaria a parte de un ARNm que codifica Serpina1" se

refiere a una región en la hebra no codificante que es sustancialmente complementaria a parte de una secuencia de ARNm de Serpina1. Si la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia diana, los desapareamientos son los más tolerados en las regiones terminales y, si están presentes, están generalmente en una región o regiones terminales, por ejemplo, dentro de 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'.

- 5 Como se demuestra en los ejemplos de trabajo más adelante, se ha descubierto sorprendentemente que un único desapareamiento de nucleótido en la región semilla de la hebra no codificante de los agentes de iARN desvelados en el presente documento fue tolerado por todas las bases, excepto C. La "región semilla" es la región en la hebra no codificante de un agente de iARN responsable del reconocimiento del ARNm diana y se corresponde con, por ejemplo, los nucleótidos 2-8 del extremo 5' de la hebra no codificante. Después de hibridarse la región semilla, Argonate somete entonces secuencias de ARNm complementarias 10 nucleótidos del extremo 5' de la hebra no codificante incorporada a la degradación nucleolítica, produciendo la escisión del ARNm diana. Por consiguiente, en una realización, la hebra no codificante de un agente de iARN de la invención comprende un desapareamiento de nucleótido en la región semilla de la hebra no codificante, por ejemplo, un desapareamiento en una cualquiera de las posiciones 2-8 del extremo 5' de la hebra no codificante.
- 10 El término "hebra codificante", como se usa en el presente documento, se refiere a la hebra de un ARNbc que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la hebra no codificante.

- Como se usa en el presente documento, el término "región de escisión" se refiere a una región que se localiza inmediatamente adyacente al sitio de escisión. El sitio de escisión es el sitio sobre la diana en el que se produce la escisión. En algunas implementaciones, la región de escisión comprende tres bases en cualquier extremo de, y inmediatamente adyacentes a, el sitio de escisión. En algunas implementaciones, la región de escisión comprende dos bases en cualquier extremo de, e inmediatamente adyacentes a, el sitio de escisión. En algunas realizaciones, el sitio de escisión se produce específicamente en el sitio unido por los nucleótidos 10 y 11 de la hebra no codificante, y la región de escisión comprende nucleótidos 11, 12 y 13.
- 20

- Como se usa en el presente documento, y a menos que se indique lo contrario, el término "complementaria", cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación con una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos para hibridarse y formar una estructura de dúplex bajo ciertas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, como entenderá el experto. Tales condiciones pueden ser, por ejemplo, condiciones rigurosas, pudiendo incluir las condiciones rigurosas: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, 50 °C o 70 °C durante 12-16 horas seguido de lavado. Pueden aplicarse otras condiciones, tales como condiciones fisiológicamente relevantes como pueden encontrarse dentro de un organismo. Por ejemplo, una secuencia complementaria es suficiente para permitir que avance la función relevante del ácido nucleico, por ejemplo, iARN. El experto podrá determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para una prueba de complementariedad de dos secuencias según la aplicación definitiva de los nucleótidos hibridados.
- 25

- Las secuencias pueden ser "completamente complementarias" entre sí cuando hay apareamiento de bases de los nucleótidos de la primera secuencia de nucleótidos con los nucleótidos de la segunda secuencia de nucleótidos a lo largo de la longitud entera de la primera y segunda secuencias de nucleótidos. Sin embargo, si una primera secuencia se denomina "sustancialmente complementaria" con respecto a una segunda secuencia en el presente documento, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias, o pueden formar uno o más, pero generalmente no más de 4, 3 o 2 pares de bases desapareados tras la hibridación, mientras que se retiene la capacidad para hibridarse en las condiciones más relevantes para su aplicación definitiva. Sin embargo, si se diseñan dos oligonucleótidos para formar, tras la hibridación, uno o más nucleótidos protuberantes monocatenarios, tales nucleótidos protuberantes no deben considerarse desapareamientos con respecto a la determinación de la complementariedad. Por ejemplo, un ARNbc que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en el que el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementaria al oligonucleótido más corto, todavía puede denominarse "completamente complementario" para los fines descritos en el presente documento.
- 30
- 35
- 40
- 45

- También pueden incluir secuencias "complementarias", como se usa en el presente documento, o formarse completamente a partir de, pares de bases no de Watson-Crick y/o pares de bases formados a partir de nucleótidos no naturales y modificados, en tanto que se cumplan todos los requisitos anteriores con respecto a su capacidad para hibridarse. Tales pares de bases no de Watson-Crick incluyen, pero no se limitan a, apareamiento de bases de Wobble o Hoogsteen G:U.
- 50

- Los términos "complementaria", "completamente complementaria" y "sustancialmente complementaria" en el presente documento pueden usarse con respecto al apareamiento de bases entre la hebra codificante y la hebra no codificante de un ARNbc, o entre la hebra no codificante de un ARNbc y una secuencia diana, como se entenderá del contexto de su uso.
- 55

Como se usa en el presente documento, un polinucleótido que es "sustancialmente complementario a al menos parte de" un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario a una porción contigua del ARNm de interés (por ejemplo, un ARNm que codifica Serpina1) que incluye una 5' UTR, un

marco de lectura abierto (ORF), o una 3' UTR. Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a al menos una parte de un ARNm de Serpina1 si la secuencia es sustancialmente complementaria a una porción no interrumpida de un ARNm que codifica Serpina1.

5 El término "inhibir", como se usa en el presente documento, se usa indistintamente con "reducir", "silenciar", "regular por disminución", "suprimir" y otros términos similares, e incluye cualquier nivel de inhibición.

10 La expresión "inhibir la expresión de un Serpina1", como se usa en el presente documento, incluye la inhibición de la expresión de cualquier gen Serpina1 (tal como, por ejemplo, un gen Serpina1 de ratón, un gen Serpina1 de rata, un gen Serpina1 de mono o un gen Serpina1 humano) además de variantes (por ejemplo, variantes que se producen naturalmente) o mutantes de un gen Serpina1. Así, el gen Serpina1 puede ser un gen Serpina1 no mutante, un gen Serpina1 de variante, un gen Serpina1 mutante o un gen Serpina1 transgénico en el contexto de una célula genéticamente manipulada, grupo de células u organismo.

15 "Inhibir la expresión de un gen Serpina1" incluye cualquier nivel de inhibición de un gen Serpina1, por ejemplo, supresión al menos parcial de la expresión de un gen Serpina1, tal como una inhibición de al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %.

25 La expresión de un gen Serpina1 puede evaluarse basándose en el nivel de cualquier variable asociada a la expresión del gen Serpina1, por ejemplo, nivel de ARNm de Serpina1, nivel de proteína Serpina1 o niveles de AAT en suero. La inhibición puede evaluarse por una disminución en un nivel absoluto o relativo de una o más de estas variables en comparación con un nivel de control. El nivel de control puede ser cualquier tipo de nivel de control que se utiliza en la materia, por ejemplo, un nivel inicial pre-dosis, o un nivel determinado a partir de un sujeto, célula o muestra similar que no está tratado o está tratado con un control (tal como, por ejemplo, control solo de tampón o control de agente inactivo).

30 La expresión "poner en contacto una célula con un agente de iARN bicatenario", como se usa en el presente documento, incluye poner en contacto una célula por cualquier medio posible. Poner en contacto una célula con un agente de iARN bicatenario incluye poner en contacto una célula *in vitro* con el agente de iARN o poner en contacto una célula *in vivo* con el agente de iARN. La puesta en contacto puede hacerse directamente o indirectamente. Así, por ejemplo, el agente de iARN puede ponerse en contacto físico con la célula por la realización individual del método, o alternativamente, el agente de iARN puede ponerse en una situación que permitirá o hará que posteriormente se ponga en contacto con la célula.

40 La puesta en contacto de una célula *in vitro* puede hacerse, por ejemplo, incubando la célula con el agente de iARN. La puesta en contacto de una célula *in vivo* puede hacerse, por ejemplo, inyectando el agente de iARN en o cerca del tejido en el que la célula se localiza, o inyectando el agente de iARN en otra área, la circulación sanguínea o el espacio subcutáneo, de forma que el agente llegará posteriormente al tejido en el que se localiza la célula que va a ponerse en contacto. Por ejemplo, el agente de iARN puede contener y/o acoplarse a un ligando, por ejemplo, un ligando de GalNAc3, que dirige el agente de iARN a un sitio de interés, por ejemplo, el hígado. También son posibles combinaciones de métodos *in vitro* e *in vivo* de poner en contacto. A propósito de los métodos de la invención, una célula también podría ponerse en contacto *in vitro* con un agente de iARN y posteriormente trasplantarse a un sujeto.

45 Un "paciente" o "sujeto", como se usa en el presente documento, pretende incluir tanto un animal humano como no humano, preferentemente un mamífero, por ejemplo, un mono. Lo más preferentemente, el sujeto o paciente es un ser humano.

50 Una "enfermedad asociada a Serpina1", como se usa en el presente documento, pretende incluir cualquier enfermedad, trastorno o afección asociada al gen o proteína Serpina1. Una enfermedad tal puede producirse, por ejemplo, por plegamiento erróneo de una proteína Serpina1, acumulación intracelular de proteína Serpina1 (por ejemplo, proteína Serpina1 erróneamente plegada), exceso de producción de proteína Serpina1, por variantes del gen Serpina1, mutaciones del gen Serpina1, por escisión anormal de la proteína Serpina1, por interacciones anormales entre Serpina1 y otras proteínas u otras sustancias endógenas o exógenas. Una enfermedad asociada a Serpina1 puede ser una enfermedad hepática y/o una enfermedad pulmonar.

55 Una "enfermedad hepática", como se usa en el presente documento, incluye una enfermedad, trastorno o afección que afecta al hígado y/o su función. Un trastorno del hígado puede ser el resultado de acumulación de proteína Serpina1 en el hígado y/o células del hígado. Ejemplos de trastornos del hígado incluyen trastornos del hígado resultantes de infecciones virales, infecciones parasíticas, predisposición genética, enfermedades autoinmunitarias,

exposición a radiación, exposición a compuestos hepatotóxicos, lesiones mecánicas, diversas toxinas ambientales, alcohol, acetaminofeno, una combinación de alcohol y acetaminofeno, anestésicos de inhalación, niacina, quimioterapéuticos, antibióticos, analgésicos, antieméticos y el suplemento herbal kava, y combinaciones de los mismos.

- 5 Por ejemplo, un trastorno del hígado asociado a deficiencia de Serpina1 puede producirse más frecuentemente en sujetos con una o más copias de ciertos alelos (por ejemplo, los alelos PIZ, PiM(Malton) y/o PIS). Sin desear quedar ligado a teoría, se cree que los alelos asociados a un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad del hígado alfa-1 antitripsina codifican formas de Serpina1 que se someten a plegamiento erróneo y no son apropiadamente secretadas de los hepatocitos. Las respuestas celulares a estas proteínas erróneamente plegadas pueden incluir la
- 10 respuesta de proteínas no plegadas (UPR), degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD), apoptosis, respuesta de sobrecarga de ER, autofagia, estrés mitocondrial y función alterada de hepatocitos. Lesiones a los hepatocitos pueden conducir a síntomas tales como, pero no se limitan a, inflamación, colestasis, fibrosis, cirrosis, ictericia obstructiva prolongada, transaminasas elevadas, hipertensión portal y/o carcinoma hepatocelular. Sin desear quedar ligado a teoría, la evolución clínica altamente variable de esta enfermedad es sugerente de
- 15 modificadores o "segundos aciertos" como contribuyentes al desarrollo de síntomas o progreso en la gravedad.

Por ejemplo, sujetos con un alelo PIZ pueden ser más sensibles a infecciones por hepatitis C o abuso de alcohol y es más probable que desarrollen un trastorno del hígado si se exponen a tales factores. Además, sujetos con fibrosis quística (CF) que llevan el alelo PIZ están en mayor riesgo de desarrollar enfermedad hepática grave con hipertensión portal. Una deficiencia de Serpina1 también puede producir o contribuir al desarrollo de enfisema de

20 aparición temprana, paniculitis necrotizante, bronquiectasia y/o ictericia neonatal prolongada. Algunos pacientes que tienen o están en riesgo de tener una deficiencia de alfa-1-antitripsina se identifican por cribado cuando tienen miembros de la familia afectados por una deficiencia de alfa-1-antitripsina.

Trastornos del hígado a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, inflamación del hígado, enfermedad hepática crónica, cirrosis, fibrosis hepática, carcinoma hepatocelular, necrosis hepática, esteatosis, colestasis y/o

25 reducción y/o pérdida de la función de hepatocitos.

"Cirrosis" es una afección patológica asociada a daño hepático crónico que incluye amplia fibrosis y nódulos regenerativos en el hígado.

"Fibrosis" es la proliferación de fibroblastos y formación de tejido cicatricial en el hígado.

La expresión "función hepática" se refiere a una o más de las muchas funciones fisiológicas realizadas por el hígado. Tales funciones incluyen, pero no se limitan a, regular los niveles de azúcar en sangre, regulación endocrina, sistemas enzimáticos, interconversión de metabolitos (por ejemplo, cuerpos cetónicos, esteroides y esteroides, y aminoácidos); fabricación de proteínas de la sangre tales como fibrinógeno, albúmina de suero y colinesterasa, función eritropoyética, desintoxicación, formación de bilis y almacenamiento de vitaminas. Se conocen en la técnica

30 varias pruebas para examinar la función hepática, que incluyen, por ejemplo, medición de alanina amino transferasa (ALT), fosfatasa alcalina, bilirrubina, protrombina y albúmina.

"Cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, pretende incluir la cantidad de un agente de iARN que, cuando se administra a un paciente para tratar una enfermedad asociada a Serpina1, es suficiente para efectuar el tratamiento de la enfermedad (por ejemplo, disminuyendo, mejorando o manteniendo la enfermedad existente o uno o más síntomas de la enfermedad). La "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar

40 dependiendo del agente de iARN, cómo el agente se administra, la enfermedad y su gravedad y la historia, edad, peso, historia familiar, constitución genética, fase de los procesos patológicos mediados por la expresión de Serpina1, los tipos de tratamientos precedentes o concomitantes, si los hay, y otras características individuales del paciente que va a tratarse.

"Cantidad profilácticamente eficaz", como se usa en el presente documento, pretende incluir la cantidad de un agente de iARN que, cuando se administran a un sujeto que todavía no experimenta o muestra los síntomas de una enfermedad asociada a Serpina1, pero que puede tener predisposición a la enfermedad, es suficiente para prevenir o mejorar la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad. Mejorar la enfermedad incluye ralentizar la evolución de la enfermedad o reducir la gravedad de la enfermedad que se desarrollará después. La "cantidad

50 profilácticamente eficaz" puede variar dependiendo del agente de iARN, cómo el agente se administra, el grado de riesgo de la enfermedad y la historia, edad, peso, historia familiar, constitución genética, los tipos de tratamientos precedentes o concomitantes, si los hay, y otras características individuales del paciente que va a tratarse.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad profilácticamente eficaz" también incluye una cantidad de un agente de iARN que produce algún efecto local o sistémico deseado a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento. Los agentes de iARN empleados en los métodos de la presente invención pueden

55 administrarse en una cantidad suficiente para producir una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a tal tratamiento.

El término "muestra", como se usa en el presente documento, incluye una colección de fluidos, células o tejidos similares aislados de un sujeto, además de fluidos, células o tejidos presentes dentro de un sujeto. Ejemplos de

fluidos biológicos incluyen sangre, suero y fluidos serosos, plasma, orina, linfa, líquido cefalorraquídeo, fluidos oculares, saliva y similares. Las muestras de tejido pueden incluir muestras de tejidos, órganos o regiones localizadas. Por ejemplo, las muestras pueden derivarse de órganos, partes de órganos, o fluidos o células particulares dentro de aquellos órganos. En ciertas realizaciones, las muestras pueden derivarse del hígado (por ejemplo, hígado completo o ciertos segmentos del hígado o ciertos tipos de células en el hígado tales como, por ejemplo, hepatocitos). En realizaciones preferidas, una "muestra derivada de un sujeto" se refiere a sangre o plasma extraído del sujeto. En otras realizaciones, una "muestra derivada de un sujeto" se refiere a tejido de hígado (o subcomponentes del mismo) derivado del sujeto.

II. ARNi de la invención

- 10 En el presente documento se describen agentes de iARN bicatenario mejorados que inhiben la expresión de un gen *Serpina1* en una célula, tal como una célula dentro de un sujeto, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano que tiene una enfermedad asociada a *Serpina1*, por ejemplo, una enfermedad del hígado, por ejemplo, enfermedad hepática crónica, inflamación del hígado, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular.

- 15 Por consiguiente, la divulgación proporciona agentes de iARN bicatenario con modificaciones químicas capaces de inhibir la expresión de un gen diana (es decir, un gen *Serpina1*) *in vivo*. En ciertos aspectos, sustancialmente todos los nucleótidos de un ARNi de la invención están modificados. En otras implementaciones, todos los nucleótidos de un ARNi de la invención están modificados. Los ARNi de la invención en los que "sustancialmente todos los nucleótidos están modificados" están en gran medida, pero no completamente modificados, e incluyen no más de 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos no modificados.

- 20 El agente de iARN comprende una hebra codificante y una hebra no codificante. Cada hebra del agente de iARN puede oscilar de 12-30 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada hebra puede tener entre 14-30 nucleótidos de longitud, 17-30 nucleótidos de longitud, 19-30 nucleótidos de longitud, 25-30 nucleótidos de longitud, 27-30 nucleótidos de longitud, 17-23 nucleótidos de longitud, 17-21 nucleótidos de longitud, 17-19 nucleótidos de longitud, 19-25 nucleótidos de longitud, 19-23 nucleótidos de longitud, 19-21 nucleótidos de longitud, 21-25 nucleótidos de longitud, o 21-23 nucleótidos de longitud.

- La hebra codificante y hebra no codificante normalmente forman un ARN bicatenario dúplex ("ARNbc"), también denominado en el presente documento un "agente de iARN". La región dúplex de un agente de iARN puede tener 12-30 pares de nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la región dúplex puede tener entre 14-30 pares de nucleótidos de longitud, 17-30 pares de nucleótidos de longitud, 27-30 pares de nucleótidos de longitud, 17-23 pares de nucleótidos de longitud, 17-21 pares de nucleótidos de longitud, 17-19 pares de nucleótidos de longitud, 19-25 pares de nucleótidos de longitud, 19-23 pares de nucleótidos de longitud, 19- 21 pares de nucleótidos de longitud, 21-25 pares de nucleótidos de longitud, o 21-23 pares de nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, la región dúplex está seleccionada de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 nucleótidos de longitud.

- En una implementación, el agente de iARN puede contener una o más regiones de nucleótidos protuberantes y/o grupos de terminación en el extremo 3', extremo 5', o ambos extremos de una o ambas hebras. Los nucleótidos protuberantes pueden tener 1-6 nucleótidos de longitud, por ejemplo 2-6 nucleótidos de longitud, 1-5 nucleótidos de longitud, 2-5 nucleótidos de longitud, 1-4 nucleótidos de longitud, 2-4 nucleótidos de longitud, 1-3 nucleótidos de longitud, 2-3 nucleótidos de longitud, o 1-2 nucleótidos de longitud. Los nucleótidos protuberantes pueden ser el resultado de una hebra que es más larga que la otra, o el resultado de dos hebras de la misma longitud que están escalonadas. Los nucleótidos protuberantes pueden formar un desapareamiento con el ARNm diana o pueden ser complementarios a las secuencias de genes que se eligen como diana o pueden ser otra secuencia. La primera y segunda hebras también pueden unirse, por ejemplo, mediante bases adicionales para formar una horquilla, o por otros conectores no de bases.

- En una implementación, los nucleótidos en la región de nucleótidos protuberantes del agente de iARN pueden cada uno ser independientemente un nucleótido modificado o no modificado que incluye, pero no se limita a, modificado con 2'-azúcar, tal como, 2'-F, 2'-O-metilo, timidina (T), 2'-O-metoxietil-5-metiluridina (Teo), 2'-O-metoxietiladenosina (Aeo), 2'-O-metoxietil-5-metilcitidina (m5Ceo), y cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, TT puede ser una secuencia de nucleótidos protuberantes para cualquier extremo en cualquier hebra. Los nucleótidos protuberantes pueden formar un desapareamiento con el ARNm diana o pueden ser complementarios a las secuencias de genes que se eligen como diana o pueden ser otra secuencia.

- Los nucleótidos protuberantes de 5' o 3' en la hebra codificante, hebra no codificante, o ambas hebras del agente de iARN, pueden estar fosforilados. En algunas implementaciones, la(s) región (regiones) de nucleótidos protuberantes contienen dos nucleótidos que tienen un fosforotioato entre los dos nucleótidos, donde los dos nucleótidos pueden ser iguales o diferentes. En una implementación, los nucleótidos protuberantes están presentes en el extremo 3' de la hebra codificante, hebra no codificante, o ambas hebras. En una implementación, este nucleótido protuberante de 3' está presente en la hebra no codificante. En una implementación, este nucleótido protuberante de 3' está presente en la hebra codificante.

El agente de iARN puede contener solo un único nucleótido protuberante, que puede reforzar la actividad de interferencia de iARN, sin afectar su estabilidad global. Por ejemplo, el nucleótido protuberante monocatenario puede estar localizado en el extremo 3' de la hebra codificante o, alternativamente, en el extremo 3' de la hebra no codificante. La iARN puede también tener un extremo romo, localizado en el extremo 5' de la hebra no codificante (o en el extremo 3' de la hebra codificante) o viceversa. Generalmente, la hebra no codificante de iARN tiene un nucleótido protuberante en el extremo 3', y el extremo 5' es romo. Aunque no se desea quedar ligado a teoría, el extremo romo asimétrico en el extremo 5' de la hebra no codificante y el nucleótido protuberante del extremo 3' de la hebra no codificante favorecen la carga de hebra guía en el proceso de RISC.

Cualquiera de los ácidos nucleicos puede sintetizarse y/o modificarse por métodos bien establecidos en la materia, tales como aquellos descritos en "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, EE.UU., que se incorpora por este documento en el presente documento por referencia. Modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones terminales, por ejemplo, modificaciones del extremo 5' (fosforilación, conjugación, enlaces invertidos) o modificaciones del extremo 3' (conjugación, nucleótidos de ADN, enlaces invertidos, etc.); modificaciones de bases, por ejemplo, sustitución con bases estabilizantes, bases desestabilizantes, o bases que emparejan bases con un repertorio extendido de componentes, eliminación de bases (nucleótidos abásicos), o bases conjugadas; modificaciones de azúcar (por ejemplo, en la posición 2' o posición 4') o sustitución de azúcar; y/o modificaciones del esqueleto, que incluyen modificación o sustitución de los enlaces fosfodiéster. Ejemplos específicos de compuestos de ARNi útiles en las realizaciones descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, ARN que contienen esqueletos modificados o enlaces internucleosídicos no naturales. ARN que tienen esqueletos modificados incluyen, entre otros, aquellos que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. Para los fines de esta memoria descriptiva, y como algunas veces se referencia en la materia, también puede considerarse que los ARN modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto internucleosídico son oligonucleósidos. En algunas implementaciones, un ARNi modificado tendrá un átomo de fósforo en su esqueleto internucleosídico.

Esqueletos de ARN modificados incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y de otros alquilo que incluyen fosfonatos de 3'-alquilo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-amino-fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados en 2'-5' de éstos, y aquellos que tienen polaridad invertida en los que los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También están incluidas diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N.º 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.195; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.316; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.625.050; 6.028.188; 6.124.445; 6.160.109; 6.169.170; 6.172.209; 6.239.265; 6.277.603; 6.326.199; 6.346.614; 6.444.423; 6.531.590; 6.534.639; 6.608.035; 6.683.167; 6.858.715; 6.867.294; 6.878.805; 7.015.315; 7.041.816; 7.273.933; 7.321.029; y la patente de EE.UU. RE39464.

Los esqueletos de ARN modificados que no incluyen un átomo de fósforo en su interior tienen esqueletos que se forman por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Éstos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes componentes mixtas de N, O, S y CH₂.

Patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N.º 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.64.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

En otras implementaciones se contemplan miméticos de ARN adecuados para su uso en ARNi, en los que tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótidos se sustituye por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Un compuesto oligomérico tal, un mimético de ARN que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un ARN se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción de amida del esqueleto. Patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Compuestos de PNA adicionales adecuados para su uso en los ARNi de la invención se describen en, por ejemplo, en Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Algunas implementaciones incluyen ARN con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomo, y en particular $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [conocido como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI], $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ y $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [en el que el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$] de la patente de EE.UU. N.º 5.489.677 anteriormente citada, y los esqueletos de amida de la patente de EE.UU. n.º 5.602.240 anteriormente citada. En algunas realizaciones, los ARN caracterizados en el presente documento tienen estructuras de esqueleto de morfolino de la patente de EE.UU. N.º 5.034.506 anteriormente citada.

Los ARN modificados también puede contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los ARNi, por ejemplo, ARNbc, caracterizados en el presente documento pueden incluir uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenoilo; O-, S- o N-alquinilo; o O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alquenoilo y alquinilo pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alquenoilo C₂ a C₁₀ sustituidos o sin sustituir y alquinilo. Modificaciones adecuadas a modo de ejemplo incluyen $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ y $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, en las que n y m son de 1 a aproximadamente 10. En otras implementaciones, los ARNbc incluyen uno de los siguientes en la posición 2': alquilo C₁ a C₁₀ inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo saliente de ARNc, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ARNi, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un ARNi, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En algunas realizaciones, la modificación incluye un 2'-metoxietoxi (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504), es decir, un grupo alcoxi-alcoxi. Otra modificación a modo de ejemplo es 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el ARN de un ARNi, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en los ARNbc enlazados en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los ARNi también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar de pentofuranosilo. Patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N.º 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.

Un ARNi también puede incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la materia simplemente como "base"). Como se usa en el presente documento, nucleobases "sin modificar" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como desoxi-timina (dT), 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halógeno, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos sustituidos en 5 y citosinas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-daazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Nucleobases adicionales incluyen las desveladas en la patente de EE.UU. n.º 3.687.808, las desveladas en Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; las desveladas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L. ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellas desveladas por Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, y las desveladas por Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, dsRNA Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Ciertas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos caracterizados en la invención. Éstas incluyen pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son sustituciones de bases a modo de ejemplo, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietilazúcar.

Patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de ciertas de las nucleobases modificadas anteriormente indicadas, además de otras nucleobases modificadas, incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N.º anteriormente indicadas 3.687.808, 4.845.205; 5.130.30; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 5.596.091; 5.614.617; 5.681.941; 5.750.692; 6.015.886; 6.147.200; 6.166.197; 6.222.025; 6.235.887; 6.380.368; 6.528.640; 6.639.062; 6.617.438; 7.045.610; 7.427.672; y 7.495.088.

El ARN de un ARNi también puede modificarse para incluir uno o más ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Un ácido nucleico bloqueado es un nucleótido que tiene un resto de ribosa modificado en el que el resto de ribosa comprende un puente adicional que conecta los carbonos 2' y 4'. Esta estructura "bloquea" eficazmente la ribosa en la conformación estructural 3'-endo. Se ha mostrado que la adición de ácidos nucleicos bloqueados a ARNi aumenta la estabilidad de ARNi en suero, y reduce los efectos inespecíficos (Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193).

Patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de nucleótidos de ácido nucleico bloqueado incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: las patentes de EE.UU. N.º 6.268.490; 6.670.461; 6.794.499; 6.998.484; 7.053.207; 7.084.125; y 7.399.845.

Modificaciones potencialmente estabilizadoras a los extremos de moléculas de ARN pueden incluir N-(acetilaminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6-NHAc), N-(caproil-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6), N-(acetil-4-hidroxiprolinol (Hyp-NHAc), timidina-2'-O-desoxitimidina (éter), N-(aminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6-amino), 2-docosanoil-uridina-3'-fosfato, dT de base invertida (idT) y otras. La divulgación de esta modificación puede encontrarse en la publicación PCT n.º WO 2011/005861.

A. ARNi modificados que comprenden motivos de la invención

En ciertos aspectos, los agentes de iARN bicatenario incluyen agentes con modificaciones químicas como se ha desvelado, por ejemplo, en la solicitud provisional de EE.UU. N.º 61/561.710, presentada el 18 de noviembre de 2011, o en el documento PCT/US2012/065691, presentado el 16 de noviembre de 2012.

Como se muestra en el presente documento y en la solicitud provisional N.º 61/561.710, puede obtenerse un resultado superior introduciendo uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en una hebra codificante y/o hebra no codificante de un agente de iARN, particularmente en o cerca del sitio de escisión. En algunas implementaciones, la hebra codificante y la hebra no codificante del agente de iARN pueden modificarse completamente de otro modo. La introducción de estos motivos interrumpe el patrón de modificación, si está presente, de la hebra codificante y/o no codificante. El agente de iARN puede estar opcionalmente conjugado con un ligando de derivado de GalNAc, por ejemplo, en la hebra codificante. Los agentes de iARN resultantes presentan actividad de silenciamiento génico superior.

Más específicamente, se ha descubierto sorprendentemente que cuando la hebra codificante y la hebra no codificante del agente de iARN bicatenario se modifican para tener uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en o cerca del sitio de escisión de al menos una hebra de un agente de iARN, la actividad de silenciamiento génico del agente de iARN se potenció superiormente.

En una realización, el agente de iARN es un oligonucleótido de extremos romos dobles de 19 nucleótidos de longitud, en el que la hebra codificante contiene al menos un motivo de tres modificaciones de 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 7, 8, 9 del extremo 5'. La hebra no codificante contiene al menos un motivo de tres modificaciones de 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 del extremo 5'.

En otra implementación, el agente de iARN es un oligonucleótido de extremos romos dobles de 20 nucleótidos de longitud, en el que la hebra codificante contiene al menos un motivo de tres modificaciones de 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 8, 9, 10 del extremo 5'. La hebra no codificante contiene al menos un motivo de tres modificaciones de 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 del extremo 5'.

En otra implementación más, el agente de iARN es un oligonucleótido de extremos romos dobles de 21 nucleótidos de longitud, en el que la hebra codificante contiene al menos un motivo de tres modificaciones de 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 9, 10, 11 del extremo 5'. La hebra no codificante contiene al menos un motivo de tres modificaciones de 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 del extremo 5'.

En una implementación, el agente de iARN comprende una hebra codificante de 21 nucleótidos y una hebra no codificante de 23 nucleótidos, en el que la hebra codificante contiene al menos un motivo de tres modificaciones de 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 9, 10, 11 del extremo 5'; la hebra no codificante contiene al menos un motivo de tres modificaciones de 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 del extremo 5', en el que un extremo del agente de iARN es romo, mientras que el otro comprende 2 nucleótidos protuberantes. Preferentemente, los 2 nucleótidos protuberantes están en el extremo 3' de la hebra no codificante. Si los 2 nucleótidos protuberantes están en el extremo 3' de la hebra no codificante, puede haber dos enlaces internucleotídicos fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en los que dos de los tres nucleótidos son los nucleótidos protuberantes, y el tercer nucleótido es un nucleótido apareado próximo al nucleótido protuberante. En una implementación, el agente de iARN tiene adicionalmente dos enlaces internucleotídicos fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales en tanto el extremo 5' de la hebra codificante como en el extremo 5' de la hebra no codificante. En una implementación, cada nucleótido en la hebra codificante y la hebra no codificante del agente de

iARN, que incluye los nucleótidos que son parte de los motivos, son nucleótidos modificados. En una realización, cada residuo está independientemente modificado con un 2'-O-metilo o 3'-flúor, por ejemplo, en un motivo alternante. Opcionalmente, el agente de iARN comprende además un ligando (preferentemente GalNAc₃).

- 5 En una implementación, el agente de iARN comprende hebras codificantes y no codificantes, en el que el agente de iARN comprende una primera hebra que tiene una longitud que es al menos 25 y como máximo 29 nucleótidos y una segunda hebra que tiene una longitud que es como máximo 30 nucleótidos con al menos un motivo de tres modificaciones de 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en la posición 11, 12, 13 del extremo 5'; en el que el extremo 3' de la primera hebra y el extremo 5' de la segunda hebra forman un extremo romo y la segunda hebra es 1-4 nucleótidos más larga en su extremo 3' que la primera hebra, en el que la región de dúplex que tiene al menos 25 nucleótidos de longitud, y la segunda hebra es suficientemente complementaria a un ARNm diana a lo largo de al menos 19 nucleótidos de la segunda longitud de hebra para reducir la expresión del gen diana cuando el agente de iARN se introduce en una célula de mamífero, y en el que la escisión con Dicer del agente de iARN produce preferencialmente un ARNip que comprende el extremo 3' de la segunda hebra, reduciéndose así la expresión del gen diana en el mamífero. Opcionalmente, el agente de iARN comprende además un ligando.
- 15 En una implementación, la hebra codificante del agente de iARN contiene al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, en la que uno de los motivos se produce en el sitio de escisión en la hebra codificante.

- En una implementación, la hebra no codificante del agente de iARN también puede contener al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, en la que uno de los motivos se produce en o cerca del sitio de escisión en la hebra no codificante.
- 20

- Para un agente de iARN que tiene una región de dúplex de 17-23 nucleótidos de longitud, el sitio de escisión de la hebra no codificante está normalmente alrededor de las posiciones 10, 11 y 12 desde el extremo 5'. Así, los motivos de tres modificaciones idénticas puede producirse en las posiciones 9, 10, 11; posiciones 10, 11, 12; posiciones 11, 12, 13; posiciones 12, 13, 14; o posiciones 13, 14, 15 de la hebra no codificante, empezando a contar desde el 1º nucleótido desde el extremo 5' de la hebra no codificante, o, empezando a contar desde el 1º nucleótido apareado dentro de la región de dúplex del extremo 5' de la hebra no codificante. El sitio de escisión en la hebra no codificante también puede cambiar según la longitud de la región de dúplex del iARN del extremo 5'.
- 25

- La hebra codificante del agente de iARN puede contener al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en el sitio de escisión de la hebra; y la hebra no codificante puede tener al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en o cerca del sitio de escisión de la hebra. Cuando la hebra codificante y la hebra no codificante forman un dúplex de ARNbc, la hebra codificante y la hebra no codificante puede alinearse de forma que un motivo de los tres nucleótidos en la hebra codificante y un motivo de los tres nucleótidos en la hebra no codificante tengan al menos un solapamiento de nucleótidos, es decir, al menos uno de los tres nucleótidos del motivo en la hebra codificante forma un par de bases con al menos uno de los tres nucleótidos del motivo en la hebra no codificante. Alternativamente, al menos dos nucleótidos pueden solaparse, o los tres nucleótidos pueden solaparse.
- 30
- 35

- En una implementación, la hebra codificante del agente de iARN puede contener más de un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos. El primer motivo puede producirse en o cerca del sitio de escisión de la hebra y los otros motivos pueden ser una modificación de ala. El término "modificación de ala" en el presente documento se refiere a un motivo que se produce en otra porción de la hebra que está separada del motivo en o cerca del sitio de escisión de la misma hebra. La modificación de ala está tanto adyacente al primer motivo como está separada por al menos uno o más nucleótidos. Cuando los motivos están inmediatamente adyacentes entre sí, entonces las químicas de los motivos son distintas entre sí y cuando los motivos están separados uno o más nucleótidos, entonces las químicas pueden ser iguales o diferentes. Pueden estar presentes dos o más modificaciones de ala. Por ejemplo, si están presentes dos modificaciones de ala, cada modificación de ala puede producirse en un extremo con respecto al primer motivo que está en o cerca del sitio de escisión o en cualquier lado del motivo principal.
- 40
- 45

- Al igual que la hebra codificante, la hebra no codificante del agente de iARN puede contener más de un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, produciéndose al menos uno de los motivos en o cerca del sitio de escisión de la hebra. Esta hebra no codificante también puede contener una o más modificaciones de ala en un alineamiento similar a las modificaciones de ala que pueden estar presentes en la hebra codificante.
- 50

- En una implementación, la modificación de ala en la hebra codificante o hebra no codificante del agente de iARN normalmente no incluye el primer nucleótido terminal o dos nucleótidos terminales en el extremo 3', extremo 5', o ambos extremos de la hebra.

- 55 En otra implementación, la modificación de ala en la hebra codificante o hebra no codificante del agente de iARN normalmente no incluye el primer nucleótido apareado o dos nucleótidos apareados dentro de la región de dúplex en el extremo 3', extremo 5', o ambos extremos de la hebra.

Si la hebra codificante y la hebra no codificante del agente de iARN contienen cada una al menos una modificación de ala, las modificaciones de ala pueden encontrarse en el mismo extremo de la región de dúplex, y tener un solapamiento de uno, dos o tres nucleótidos.

Si la hebra codificante y la hebra no codificante del agente de iARN contienen cada una al menos dos modificaciones de ala, la hebra codificante y la hebra no codificante pueden alinearse de forma que dos modificaciones cada una de una hebra se encuentren en un extremo de la región de dúplex, que tiene un solapamiento de uno, dos o tres nucleótidos; dos modificaciones cada una de una hebra se encuentran en el otro extremo de la región de dúplex, que tiene un solapamiento de uno, dos o tres nucleótidos; dos modificaciones de una hebra se encuentren en cada lado del motivo principal, que tiene un solapamiento de uno, dos o tres nucleótidos en la región de dúplex.

En una implementación, cada nucleótido en la hebra codificante y la hebra no codificante del agente de iARN, que incluye los nucleótidos que son parte de los motivos, puede modificarse. Cada nucleótido puede modificarse con la misma modificación o modificación diferente que puede incluir una o más de alteración de uno o ambos de los oxígenos del fosfato no de enlace y/o de uno o más de los oxígenos del fosfato de enlace; alteración de un constituyente del azúcar de ribosa, por ejemplo, del 2'-hidroxilo en el azúcar de ribosa; sustitución completa del resto fosfato con conectores "defosfo"; modificación o sustitución de una base que se produce naturalmente; y sustitución o modificación del esqueleto de ribosa-fosfato.

Como los ácidos nucleicos son polímeros de subunidades, muchas de las modificaciones se producen en una posición que se repite dentro de un ácido nucleico, por ejemplo, una modificación de una base, o un resto fosfato, o un O no de enlace de un resto fosfato. En algunos casos, la modificación se producirá en todas las posiciones objeto en el ácido nucleico, pero en muchos casos no se producirá. A modo de ejemplo, una modificación solo puede producirse en una posición del extremo 3' o 5', solo puede producirse en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los 2, 3, 4, 5 o 10 últimos nucleótidos de una hebra. Una modificación puede producirse en una región bicatenaria, una región monocatenaria, o en ambas. Una modificación solo puede producirse en la región bicatenaria de un ARN o solo puede producirse en una región monocatenaria de un ARN. Por ejemplo, una modificación de fosforotioato en una posición de O no de enlace solo puede producirse en uno o ambos extremos, solo puede producirse en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los 2, 3, 4, 5 o 10 últimos nucleótidos de una hebra, o puede producirse en regiones bicatenarias y monocatenarias, particularmente en los extremos. El extremo o extremos 5' pueden estar fosforilados.

Puede ser posible, por ejemplo, potenciar la estabilidad, para incluir bases particulares en nucleótidos protuberantes, o para incluir nucleótidos modificados o sustitutos de nucleótidos, en nucleótidos protuberantes monocatenarios, *por ejemplo*, en un nucleótido protuberante de 5' o 3', o en ambos. Por ejemplo, puede desearse incluir nucleótidos de purina en nucleótidos protuberantes. En algunas realizaciones, todas o algunas de las bases en un nucleótido protuberante de 3' o 5' puede modificarse, por ejemplo, con una modificación descrita en el presente documento. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, el uso de modificaciones en la posición 2' del azúcar de ribosa con modificaciones que se conocen en la técnica, por ejemplo, el uso de desoxirribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-flúor (2'-F) o 2'-O-metilo modificados en lugar del riboazúcar de la nucleobase, y modificaciones en el grupo fosfato, por ejemplo, modificaciones de fosforotioato. Los nucleótidos protuberantes no necesitan ser homólogos a la secuencia diana.

En una implementación, cada residuo de la hebra codificante y hebra no codificante está independientemente modificado con LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-desoxi, 2'-hidroxilo o 2'-flúor. Las hebras pueden contener más de una modificación. En una implementación, cada residuo de la hebra codificante y hebra no codificante está independientemente modificado con 2'-O-metilo o 2'-flúor.

Normalmente están presentes al menos dos modificaciones diferentes en la hebra codificante y la hebra no codificante. Aquellas dos modificaciones pueden ser las modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-flúor, u otras.

En una implementación, N_a y/o N_b comprenden modificaciones de un patrón alternante. El término "motivo alternante", como se usa en el presente documento, se refiere a un motivo que tiene una o más modificaciones, produciéndose cada modificación en nucleótidos alternantes de una hebra. El nucleótido alternante puede referirse a uno por cada dos nucleótidos o uno por cada tres nucleótidos, o un patrón similar. Por ejemplo, si A, B y C representan cada uno un tipo de modificación al nucleótido, el motivo alternante puede ser "ABABABABAB...", "AABBAABBAABB...", "AABAABAABAAB...", "AAABAAABAAAB...", "AAABBBAAABBB..." o "ABCABCABCABC...", etc.

El tipo de modificaciones contenidas en el motivo alternante pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, si A, B, C, D representan cada uno un tipo de modificación en el nucleótido, el patrón alternante, es decir, las modificaciones en cada dos nucleótidos pueden ser las mismas, pero cada una de la hebra codificante o hebra no codificante puede seleccionarse de varias posibilidades de modificaciones dentro del motivo alternante tal como "ABABAB...", "ACACAC..." "BDBDBD..." o "CDCDCD...", etc.

En una implementación, el agente de iARN de la invención comprende el patrón de modificación para el motivo alternante en la hebra codificante con respecto al patrón de modificación para el motivo alternante en la hebra no

codificante desplazado. El desplazamiento puede ser tal que el grupo modificado de nucleótidos de la hebra codificante se corresponda con un grupo modificado de otro modo de nucleótidos de la hebra no codificante y viceversa. Por ejemplo, cuando se aparea la hebra codificante con la hebra no codificante en el dúplex de ARNbc, el motivo alternante en la hebra codificante puede empezar con "ABABAB" de 5'-3' de la hebra y el motivo alternante en la hebra no codificante puede empezar con "BABABA" de 5'-3' de la hebra dentro de la región de dúplex. Como otro ejemplo, el motivo alternante en la hebra codificante puede empezar con "AABBAABB" de 5'-3' de la hebra y el motivo alternante en la hebra no codificante puede empezar con "BBAABBAA" de 5'-3' de la hebra dentro de la región de dúplex, de manera que haya un desplazamiento completo o parcial de los patrones de modificación entre la hebra codificante y la hebra no codificante.

En una implementación, el agente de iARN que comprende el patrón del motivo alternante de modificación de 2'-O-metilo y modificación de 2'-F en la hebra codificante tiene inicialmente un desplazamiento con respecto al patrón del motivo alternante de modificación de 2'-O-metilo y modificación de 2'-F en la hebra no codificante inicialmente, es decir, el nucleótido modificado con 2'-O-metilo en la hebra codificante aparea bases con un nucleótido modificado con 2'-F en la hebra no codificante y viceversa. La posición 1 de la hebra codificante puede empezar con la modificación de 2'-F y la posición 1 de la hebra no codificante puede empezar con la modificación 2'-O-metilo.

La introducción de uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos a la hebra codificante y/o hebra no codificante interrumpe el patrón de modificación inicial presente en la hebra codificante y/o hebra no codificante. Esta interrupción del patrón de modificación de la hebra codificante y/o no codificante introduciendo uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos a la hebra codificante y/o no codificante potencia sorprendentemente la actividad de silenciamiento génico para el gen diana.

En una implementación, si el motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos se introduce a cualquiera de las hebras, la modificación del nucleótido siguiente al motivo es una modificación diferente a la modificación del motivo. Por ejemplo, la porción de la secuencia que contiene el motivo es "...N_aYYYN_b...", en la que "Y" representa la modificación del motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y "N_a" y "N_b" representan una modificación al nucleótido siguiente al motivo "YYY" que es diferente de la modificación de Y, y en la que N_a y N_b pueden ser modificaciones iguales o diferentes. Alternativamente, N_a y/o N_b pueden estar presentes o ausentes cuando está presente una modificación de ala.

El agente de iARN puede comprender además al menos un enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato. La modificación del enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato puede producirse en cualquier nucleótido de la hebra codificante o hebra no codificante o ambas hebras en cualquier posición de la hebra. Por ejemplo, la modificación del enlace internucleotídico puede producirse en cada nucleótido en la hebra codificante y/o hebra no codificante; cada modificación del enlace internucleotídico puede producirse en un patrón alternante en la hebra codificante y/o hebra no codificante; o la hebra codificante o hebra no codificante puede contener ambas modificaciones del enlace internucleotídico en un patrón alternante. El patrón alternante de la modificación del enlace internucleotídico en la hebra codificante puede ser igual o diferente de aquel de la hebra no codificante, y el patrón alternante de la modificación del enlace internucleotídico en la hebra codificante puede tener un desplazamiento con respecto al patrón alternante de la modificación del enlace internucleotídico en la hebra no codificante.

En una implementación, la iARN comprende una modificación del enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato en la región de nucleótidos protuberantes. Por ejemplo, la región de nucleótidos protuberantes puede contener dos nucleótidos que tienen un enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato entre los dos nucleótidos. También pueden hacerse modificaciones del enlace internucleotídico para enlazar los nucleótidos protuberantes con los nucleótidos apareados terminales dentro de la región de dúplex. Por ejemplo, al menos 2, 3, 4, o todos los nucleótidos protuberantes, pueden estar enlazados mediante enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato, y opcionalmente, puede haber enlaces internucleotídicos fosforotioato o metilfosfonato adicionales que enlacen el nucleótido protuberante con un nucleótido apareado que está junto al nucleótido protuberante. Por ejemplo, puede haber al menos dos enlaces internucleotídicos fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en los que dos de los tres nucleótidos son nucleótidos protuberantes, y el tercero es un nucleótido apareado junto al nucleótido protuberante. Estos tres nucleótidos terminales pueden estar en el extremo 3' de la hebra no codificante, el extremo 3' de la hebra codificante, el extremo 5' de la hebra no codificante y/o el extremo 5' de la hebra no codificante.

En una implementación, los 2 nucleótidos protuberantes están en el extremo 3' de la hebra no codificante, y hay dos enlaces internucleotídicos fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en la que dos de los tres nucleótidos son los nucleótidos protuberantes, y el tercer nucleótido es un nucleótido apareado junto al nucleótido protuberante. Opcionalmente, el agente de iARN puede tener adicionalmente os enlaces internucleotídicos fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales en tanto el extremo 5' de la hebra codificante como en el extremo 5' de la hebra no codificante.

En una implementación, el agente de iARN comprende desapareamiento(s) con la diana, dentro del dúplex, o combinaciones de los mismos. Un "desapareamiento puede ser apareamiento de bases no canónico u otro apareamiento distinto de canónico de nucleótidos. El desapareamiento puede producirse en la región de nucleótidos

protuberantes o la región de dúplex. El par de bases puede clasificarse basándose en su tendencia a promover la disociación o fusión (por ejemplo, en la energía de asociación libre o disociación de un apareamiento particular, el enfoque más simple es examinar los pares en un par de bases individual, aunque también pueden usarse el vecino siguiente o análisis similares). En términos de promover la disociación: se prefiere A:U a G:C; se prefiere G:U a G:C; y se prefiere I:C a G:C (I=inosina). Se prefieren los desapareamientos, por ejemplo, no canónicos o distintos de apareamientos canónicos (como se describe en cualquier parte en el presente documento) a los apareamientos canónicos (A:T, A:U, G:C); y se prefieren apareamientos que incluyen una base universal a los apareamientos canónicos. Una "base universal" es una base que presenta la capacidad de sustituir cualquiera de las cuatro bases normales (G, C, A y U) sin desestabilizar significativamente las interacciones de pares de bases vecinas o alterar la utilidad bioquímica funcional esperada del oligonucleótido modificado. Ejemplos no limitantes de bases universales incluyen 2'-desoxiinosina (hipoxantina desoxinucleótido) o sus derivados, análogos de nitroazol, y bases de unión no a hidrógeno aromáticas hidrófobas.

En una implementación, el agente de iARN comprende al menos uno del primer 1, 2, 3, 4 o 5 pares de bases dentro de las regiones de dúplex del extremo 5' de la hebra no codificante seleccionados independientemente del grupo de: A:U, G:U, I:C, y pares desapareados, por ejemplo, apareamientos no canónicos o distintos de canónicos o apareamientos que incluyen una base universal, para promover la disociación de la hebra no codificante en el extremo 5' del dúplex.

En una implementación, el nucleótido en la posición 1 dentro de la región de dúplex del extremo 5' en la hebra no codificante está seleccionado del grupo que consiste en A, dA, dU, U y dT. Alternativamente, al menos uno del primer 1, 2 o 3 pares de bases dentro de la región de dúplex del extremo 5' de la hebra no codificante es un par de bases AU. Por ejemplo, el primer par de bases dentro de la región de dúplex del extremo 5' de la hebra no codificante es un par de bases AU.

En otra implementación, el nucleótido en el extremo 3' de la hebra codificante es desoxi-timina (dT). En otra realización, el nucleótido en el extremo 3' de la hebra no codificante es desoxi-timina (dT). En una implementación, hay una secuencia corta de nucleótidos de desoxi-timina, por ejemplo, dos nucleótidos dT en el extremo 3' de la hebra codificante y/o no codificante.

En una realización, la secuencia de la hebra codificante puede representarse por la fórmula (I):

$$5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3' \quad (I)$$

en la que:

i y j son cada uno independientemente 0 o 1;

p y q son cada uno independientemente 0-6;

cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos modificados, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

cada N_b representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos modificados;

cada n_p y n_q representan independientemente un nucleótido protuberante;

en la que N_b y Y no tienen la misma modificación; y

XXX, YYY y ZZZ representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos. Preferentemente, YYY es todos nucleótidos modificados con 2'-F.

En una implementación, N_a y/o N_b comprenden modificaciones de patrón alternante.

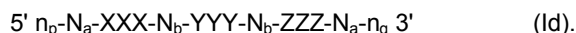
En una implementación, el motivo YYY se produce en o cerca del sitio de escisión de la hebra codificante. Por ejemplo, si el agente de iARN tiene una región de dúplex de 17-23 nucleótidos de longitud, el motivo YYY puede producirse en o la vecindad del sitio de escisión (por ejemplo: puede producirse en las posiciones 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 u 11, 12, 13) de - la hebra codificante, empezando a contar desde el 1º nucleótido, desde el extremo 5'; u opcionalmente, empezando a contar en el 1º nucleótido apareado dentro de la región de dúplex, desde el extremo 5'.

En una implementación, i es 1 y j es 0, o i es 0 y j es 1, o tanto i como j son 1. La hebra codificante puede, por tanto, representarse por las siguientes fórmulas:

$$5' n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3' \quad (Ib);$$

$$5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q 3' \quad (Ic);$$

o



Si la hebra codificante se representa por la fórmula (Ib), N_b representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a puede representar independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Si la hebra codificante se representa como la fórmula (Ic), N_b representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a puede representar independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Si la hebra codificante se representa como la fórmula (Id), cada N_b representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Preferentemente, N_b es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6, cada N_a puede representar independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

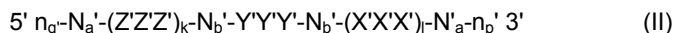
Cada uno de X, Y y Z puede ser igual o diferente entre sí.

En otras implementaciones, i es 0 y j es 0, y la hebra codificante puede representarse por la fórmula:



Si la hebra codificante se representa por la fórmula (Ia), cada N_a puede representar independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

En una implementación, la secuencia de la hebra no codificante de la iARN puede representarse por la fórmula (II):



en la que:

k y l son cada uno independientemente 0 o 1;

p' y q' son cada uno independientemente 0-6;

cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos modificados, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

cada N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos modificados;

cada n_p' y n_q' representan independientemente un nucleótido protuberante;

en la que N_b' y Y' no tienen la misma modificación;

y

$X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ y $Z'Z'Z'$ representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos.

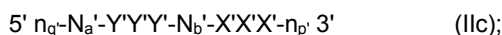
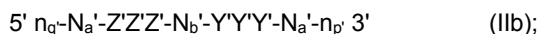
En una implementación, N_a' y/o N_b' comprenden modificaciones de patrón alternante.

El motivo $Y'Y'Y'$ se produce en o cerca del sitio de escisión de la hebra no codificante. Por ejemplo, si el agente de iARN tiene una región de dúplex de 17-23 nucleótidos de longitud, el motivo $Y'Y'Y'$ puede producirse en las posiciones 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; o 13, 14, 15 de la hebra no codificante, empezando a contar desde el 1º nucleótido, desde el extremo 5'; u opcionalmente, empezando a contar en el 1º nucleótido apareado dentro de la región de dúplex, desde el extremo 5'. Preferentemente, el motivo $Y'Y'Y'$ se produce en las posiciones 11, 12, 13.

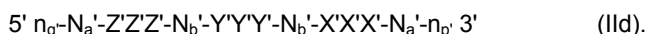
En una implementación, el motivo $Y'Y'Y'$ es todo nucleótidos modificados con 2'-OMe.

En una implementación, k es 1 y l es 0, o k es 0 y l es 1, o tanto k como l son 1.

La hebra no codificante puede, por tanto, representarse por las siguientes fórmulas:



o

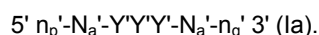


Si la hebra no codificante se representa por la fórmula (IIb), N_b' representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

- 5 Si la hebra no codificante se representa como la fórmula (IIc), N_b' representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

- 10 Si la hebra no codificante se representa como la fórmula (IIId), cada N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados. Preferentemente, N_b es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En otras implementaciones, k es 0 y l es 0 y la hebra no codificante puede representarse por la fórmula:



- 15 Si la hebra no codificante se representa como la fórmula (IIa), cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cada uno de X' , Y' y Z' puede ser igual o diferente entre sí.

- 20 Cada nucleótido de la hebra codificante y la hebra no codificante puede estar independientemente modificado con LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-hidroxilo o 2'-flúor. Por ejemplo, cada nucleótido de la hebra codificante y la hebra no codificante está independientemente modificado con 2'-O-metilo o 2'-flúor. Cada X , Y , Z , X' , Y' y Z' , en particular, puede representar una modificación de 2'-O-metilo o una modificación de 2'-flúor.

- 25 En una implementación, la hebra codificante del agente de iARN puede contener el motivo YYY que se produce en las posiciones 9, 10 y 11 de la hebra cuando la región de dúplex tiene 21 nt, empezando a contar desde el 1º nucleótido desde el extremo 5', u opcionalmente, empezando a contar en el 1º nucleótido apareado dentro de la región de dúplex, desde el extremo 5'; y Y' representa modificación de 2'-F. La hebra codificante puede contener adicionalmente un motivo XXX o motivos ZZZ como modificaciones de ala en el extremo opuesto de la región de dúplex; y XXX y ZZZ representan cada uno independientemente una modificación de 2'-OME o modificación de 2'-F.

- 30 En una implementación la hebra no codificante puede contener el motivo $Y'Y'Y'$ que se produce en las posiciones 11, 12, 13 de la hebra, empezando a contar desde el 1º nucleótido desde el extremo 5', u opcionalmente, empezando a contar en el 1º nucleótido apareado dentro de la región de dúplex, desde el extremo 5'; y Y' representa modificación de 2'-O-metilo. La hebra no codificante puede contener adicionalmente un motivo $X'X'X'$ o motivos $Z'Z'Z'$ como modificaciones de ala en el extremo opuesto de la región de dúplex; y $X'X'X'$ y $Z'Z'Z'$ representan cada uno independientemente una modificación de 2'-OME o modificación de 2'-F.

- 35 La hebra codificante representada por una cualquiera de las fórmulas (Ia), (Ib), (Ic) y (Id) anteriores forma un dúplex con una hebra no codificante que se representa por una cualquiera de las fórmulas (IIa), (IIb), (IIc) y (IIId), respectivamente.

Por consiguiente, los agentes de iARN para su uso en los métodos descritos pueden comprender una hebra codificante y una hebra no codificante, teniendo cada hebra 14 a 30 nucleótidos, el dúplex de iARN representado por la fórmula (III):

- 40 sentido: $5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q' 3'$
antisentido: $3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q' 5'$

(III)

en la que:

i , j , k y l son cada uno independientemente 0 o 1;

p , p' , q y q' son cada uno independientemente 0-6;

- 45 cada N_a y N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos modificados, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

cada N_b y N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos modificados;

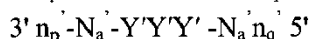
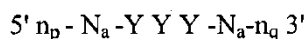
en la que

cada n_p' , n_p , n_q' y n_q , cada uno de los cuales puede o puede no estar presente, representa independientemente un nucleótido protuberante; y

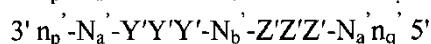
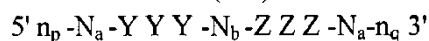
- 5 XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' y Z'Z'Z' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos.

En una implementación, i es 0 y j es 0; o i es 1 y j es 0; o i es 0 y j es 1; o tanto i como j son 0; o tanto i como j son 1. En otra implementación, k es 0 y l es 0; o k es 1 y l es 0; k es 0 y l es 1; o tanto k como l son 0; o tanto k como l son 1.

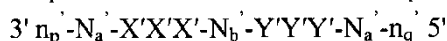
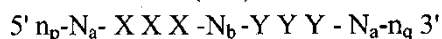
- 10 Combinaciones a modo de ejemplo de la hebra codificante y la hebra no codificante que forman un dúplex de iARN incluyen las siguientes fórmulas:



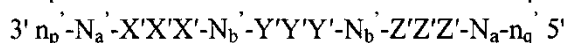
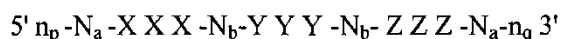
(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIId)

- 15 Si el agente de iARN se representa por la fórmula (IIIa), cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

- Si el agente de iARN se representa por la fórmula (IIIb), cada N_b representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 1-10, 1-7, 1-5 o 1-4 nucleótidos modificados. Cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

- Si el agente de iARN se representa como la fórmula (IIIc), cada N_b , N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

- 25 Si el agente de iARN se representa como la fórmula (IIId), cada N_b , N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a , N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados. Cada uno de N_a , N_a' , N_b y N_b' comprende independientemente modificaciones de patrón alternante.

- 30 Cada uno de X, Y y Z en las fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId) puede ser igual o diferente entre sí.

Si el agente de iARN se representa por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId), al menos uno de los nucleótidos Y puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos Y'. Alternativamente, al menos dos de los nucleótidos Y forman pares de bases con los nucleótidos Y' correspondientes; o los tres de los nucleótidos Y forman todos pares de bases con los nucleótidos Y' correspondientes.

- 35 Si el agente de iARN se representa por la fórmula (IIIb) o (IIId), al menos uno de los nucleótidos Z puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos Z'. Alternativamente, al menos dos de los nucleótidos Z forman pares de bases con los nucleótidos Z' correspondientes; o los tres de los nucleótidos Z forman todos pares de bases con los nucleótidos Z' correspondientes.

- 40 Si el agente de iARN se representa como la fórmula (IIIc) o (IIId), al menos uno de los nucleótidos X puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos X'. Alternativamente, al menos dos de los X nucleótidos forman pares de bases con los nucleótidos X' correspondientes; o los tres de los X nucleótidos forman todos pares de bases con los nucleótidos X' correspondientes.

En una implementación, la modificación en el nucleótido Y es diferente de la modificación en el nucleótido Y', la modificación en el nucleótido Z es diferente de la modificación en el nucleótido Z', y/o la modificación en el nucleótido X es diferente de la modificación en el nucleótido X'.

- 5 En una implementación, si el agente de iARN se representa por la fórmula (IIId), las modificaciones en N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-flúor. En otra implementación, si el agente de iARN se representa por la fórmula (IIId), las modificaciones en N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-flúor y $n_p' > 0$ y al menos un n_p' está ligado a un nucleótido vecino mediante enlace fosforotioato. En otra implementación más, si el agente de iARN se representa por la fórmula (IIId), las modificaciones en N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-flúor, $n_p' > 0$ y al menos un n_p' está ligado a un nucleótido vecino mediante enlace fosforotioato, y la hebra codificante está conjugada con uno o
- 10 más derivados de GalNAc unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente. En otra implementación, si el agente de iARN se representa por la fórmula (IIId), las modificaciones en N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-flúor, $n_p' > 0$ y al menos un n_p' está ligado a un nucleótido vecino mediante enlace fosforotioato, la hebra codificante comprende al menos un enlace fosforotioato y la hebra codificante está conjugada con uno o más derivados de GalNAc unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente.
- 15 En una implementación, si el agente de iARN se representa por la fórmula (IIIa), las modificaciones en N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-flúor, $n_p' > 0$ y al menos un n_p' está ligado a un nucleótido vecino mediante enlace fosforotioato, la hebra codificante comprende al menos un enlace fosforotioato y la hebra codificante está conjugada con uno o más derivados de GalNAc unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente.
- 20 En una implementación, el agente de iARN es un multímero que contiene al menos dos dúplex representados por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId), en el que los dúplex están conectados por un conector. El conector puede ser escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero comprende además un ligando. Cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen o a dos genes diferentes; o cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen en dos sitios diana diferentes.
- 25 En una implementación, el agente de iARN es un multímero que contiene tres, cuatro, cinco, seis o más dúplex representados por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId), en el que los dúplex están conectados por un conector. El conector puede ser escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero comprende además un ligando. Cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen o a dos genes diferentes; o cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen en dos sitios diana diferentes.
- 30 En una implementación, dos agentes de iARN representados por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId) están enlazados entre sí en el extremo 5', y uno o ambos de los extremos 3' y están opcionalmente conjugados con un ligando. Cada uno de los agentes puede dirigirse al mismo gen o a dos genes diferentes; o cada uno de los agentes puede dirigirse al mismo gen en dos sitios diana diferentes.
- 35 Diversas publicaciones describen agentes de iARN multiméricos que pueden usarse en los métodos de la invención. Tales publicaciones incluyen el documento WO2007/091269, patente de EE.UU. N.º 7858769, documentos WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 y WO2011/031520.
- 40 El agente de iARN que contiene conjugaciones de uno o más restos de hidrato de carbono con un agente de iARN puede optimizar una o más propiedades del agente de iARN. En muchos casos, el resto de hidrato de carbono se unirá a una subunidad modificada del agente de iARN. Por ejemplo, el azúcar de ribosa de una o más subunidades de ribonucleótido de un agente de ARNbc puede sustituirse con otro resto, por ejemplo, un vehículo no de hidrato de carbono (preferentemente cíclico) con el que está unido un ligando de hidrato de carbono. Una subunidad de ribonucleótido en la que el azúcar de ribosa de la subunidad se ha sustituido así se denomina en el presente documento una subunidad de modificación de sustitución de ribosa (RRMS). Un vehículo cíclico puede ser un sistema de anillos carbocíclicos, es decir, todos los átomos de anillo son átomos de carbono, o un sistema de anillos heterocíclicos, es decir, uno o más átomos del anillo pueden ser un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno,
- 45 azufre. El vehículo cíclico puede ser un sistema de anillos monocíclicos, o puede contener dos o más anillos, por ejemplo, anillos condensados. El vehículo cíclico puede ser un sistema de anillos completamente saturados, o puede contener uno o más dobles enlaces.
- 50 El ligando puede unirse al polinucleótido mediante un vehículo. Los vehículos incluyen (i) al menos un "punto de unión al esqueleto", preferentemente dos "puntos de unión al esqueleto" y (ii) al menos un "punto de unión al anclaje". Un "punto de unión al esqueleto", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo funcional, por ejemplo, un grupo hidroxilo, o generalmente, un enlace disponible para, y que es adecuado para la incorporación del vehículo en el esqueleto, por ejemplo, el esqueleto de fosfato, o fosfato modificado, por ejemplo, que contiene azufre, de un ácido ribonucleico. Un "punto de unión al anclaje" (TAP) en algunas realizaciones se refiere a un átomo del anillo constituyente del vehículo cíclico, por ejemplo, un átomo de carbono o un heteroátomo (distinto de un
- 55 átomo que proporciona un punto de unión al esqueleto), que conecta un resto seleccionado. El resto puede ser, por ejemplo, un hidrato de carbono, por ejemplo monosacárido, disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido y polisacárido. Opcionalmente, el resto seleccionado está conectado por un anclaje intermedio al vehículo cíclico. Así, el vehículo cíclico frecuentemente incluirá un grupo funcional, por ejemplo, un grupo amino, o generalmente,

proporcionará un enlace, que es adecuado para la incorporación o anclaje de otra entidad química, por ejemplo, un ligando al anillo constituyente.

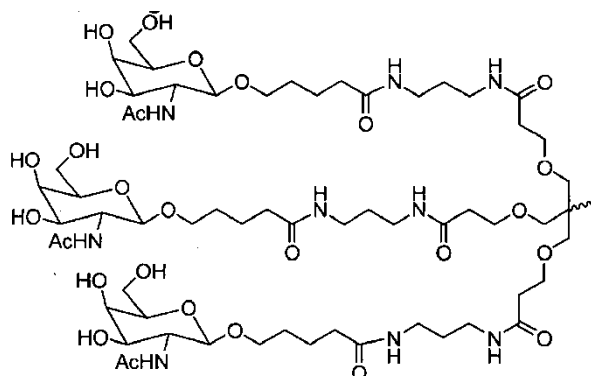
Los agentes de iARN pueden conjugarse con un ligando mediante un vehículo, en el que el vehículo puede ser grupo cíclico o grupo acíclico; preferentemente, el grupo cíclico está seleccionado de pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, [1,3]dioxolano, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo, tetrahidrofurilo y decalina; preferentemente, el grupo acíclico está seleccionado de esqueleto de serinol o esqueleto de dietanolamina.

En ciertas implementaciones específicas, el agente de iARN para su uso en los métodos de la invención es un agente seleccionado del grupo de agentes enumerados en una cualquiera de las Tablas 1, 2, 5 y 7.

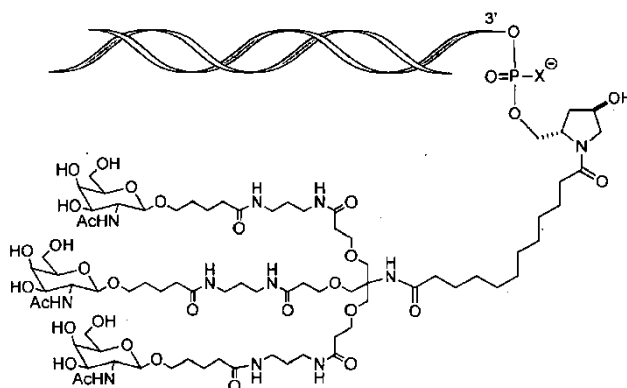
Estos agentes pueden comprender además un ligando.

A. Ligandos

Los agentes de ARN bicatenario (ARNbc) pueden conjugarse opcionalmente con uno o más ligandos. El ligando puede unirse a la hebra codificante, hebra no codificante o ambas hebras, en el extremo 3', extremo 5' o ambos extremos. Por ejemplo, el ligando puede conjugarse con la hebra codificante. En realizaciones preferidas, el ligando se conjuga con el extremo 3' de la hebra codificante. En una realización preferida, el ligando es un ligando de GalNAc. En realizaciones particularmente preferidas, el ligando es GalNAc₃:



En algunas implementaciones, el ligando, por ejemplo, ligando de GalNAc, está unido al extremo 3' del agente de iARN. En una implementación, el agente de iARN está conjugado con el ligando, por ejemplo, ligando de GalNAc, como se muestra en el siguiente esquema



en el que X es O o S. En una implementación, X es O.

Puede acoplarse una amplia variedad de entidades a los agentes de iARN de la presente invención. Restos preferidos son ligandos, que se acoplan, preferentemente covalentemente, tanto directa como indirectamente mediante un anclaje intermedio.

En implementaciones preferidas, un ligando altera la distribución, elección de diana o vida útil de la molécula en la que se incorpora. En realizaciones preferidas, un ligando proporciona una afinidad potenciada por una diana seleccionada, por ejemplo, molécula, célula o tipo de célula, compartimento, receptor, por ejemplo, un compartimento celular o de órgano, tejido, órgano o región del cuerpo, como, por ejemplo, en comparación con una especie tal como un ligando. Los ligandos que proporcionan afinidad potenciada por una diana seleccionada también se llaman ligandos que eligen diana.

Algunos ligandos pueden tener propiedades endosomolíticas. Los ligandos endosomolíticos promueven la lisis del endosoma y/o transporte de la composición de la invención, o sus componentes, del endosoma al citoplasma de la célula. El ligando endosomolítico puede ser un péptido polianiónico o peptidomimético que muestra actividad de la membrana dependiente del pH y fusogenicidad. En una implementación, el ligando endosomolítico asume su conformación activa a pH endosómico. La conformación "activa" es aquella conformación en la que el ligando endosomolítico promueve la lisis del endosoma y/o transporte de la composición de la invención, o sus componentes, del endosoma al citoplasma de la célula. Ligandos endosomolíticos a modo de ejemplo incluyen el péptido GALA (Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972), el péptido EALA (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586) y sus derivados (Turk et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68). En una realización, el componente endosomolítico puede contener un grupo químico (por ejemplo, un aminoácido) que experimentará un cambio en la carga o protonación en respuesta a un cambio en el pH. El componente endosomolítico puede ser lineal o ramificado.

Los ligandos pueden mejorar las propiedades de transporte, hibridación y especificidad y también pueden mejorar la resistencia a nucleasas del oligorribonucleótido natural o modificado resultante, o una molécula polimérica que comprenda cualquier combinación de monómeros descritos en el presente documento y/o ribonucleótidos naturales o modificados.

Los ligandos pueden incluir en general modificadores terapéuticos, por ejemplo, para potenciar la captación; compuestos de diagnóstico o grupos indicadores, por ejemplo, para monitorizar la distribución; agentes de reticulación; y restos que confieren resistencia a nucleasas. Ejemplos generales incluyen lípidos, esteroides, vitaminas, azúcares, proteínas, péptidos, poliaminas y peptidomiméticos.

Los ligandos pueden incluir una sustancia que se produce naturalmente, tal como una proteína (por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL) o globulina); un hidrato de carbono (por ejemplo, un dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico); o un lípido. El ligando también puede ser una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, por ejemplo, un poliaminoácido sintético, un oligonucleótido (por ejemplo, un aptámero). Ejemplos de poliaminoácidos incluyen poliaminoácido es una polilisina (PLL), ácido poli-L-aspartico, ácido poli-L-glutámico, copolímero de estireno- anhídrido de ácido maleico, copolímero de poli(L-lactida-co-glicolida), copolímero de éter divinílico-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrilico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfazina. Ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimética, poliamina dendrímica, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina, o un péptido helicoidal alfa.

Los ligandos también pueden incluir grupos que eligen diana, por ejemplo, un agente que elige como diana célula o tejido, por ejemplo, una lectina, glucoproteína, lípido o proteína, por ejemplo, un anticuerpo, que se une a un tipo de célula especificada tal como una célula de riñón. Un grupo que elige diana puede ser una tirotropina, melanotropina, lectina, glucoproteína, proteína A tensioactiva, hidrato de carbono de mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácidos glucosilados, galactosa multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, biotina, un péptido RGD, un peptidomimético de RGD o un aptámero.

Otros ejemplos de ligandos incluyen colorantes, agentes intercalantes (por ejemplo, acridinas), reticulantes (por ejemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafrina, safirinas), hidrocarburos aromáticos policíclicos (por ejemplo, fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales o un quelante (por ejemplo, EDTA), moléculas lipófilas, por ejemplo, colesterol, ácido cólico, ácido adamantanoacético, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxazina) y conjugados de péptidos (por ejemplo, péptido de Antennapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por ejemplo, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (por ejemplo, biotina), facilitadores del transporte/absorción (por ejemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, agrupaciones de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos de Eu³⁺ de tetraazamacrociclos), dinitrofenilo, HRP o AP.

Los ligandos pueden ser proteínas, por ejemplo, glucoproteínas, o péptidos, por ejemplo, moléculas que tienen una afinidad específica por un co-ligando, o anticuerpos, por ejemplo, un anticuerpo, que se une a un tipo de célula especificada tal como una célula cancerosa, célula endotelial o célula ósea. Los ligandos también pueden incluir hormonas y receptores de hormonas. También pueden incluir especies no peptídicas, tales como lípidos, lectinas, hidratos de carbono, vitaminas, cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetilgalactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente, fucosa multivalente o aptámeros. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de MAP cinasa p38, o un activador de NF-κB.

El ligando puede ser una sustancia, por ejemplo, un fármaco, que puede aumentar la captación del agente de ARNi en la célula, por ejemplo, rompiendo el citoesqueleto de la célula, por ejemplo, rompiendo los microtúbulos, microfilamentos y/o filamentos intermedios de la célula. El fármaco puede ser, por ejemplo, taxon, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, jasplakinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina o mioservina.

- 5 El ligando puede aumentar la captación del oligonucleótido en la célula, por ejemplo, activando una respuesta inflamatoria. Ligandos a modo de ejemplo que tendrían un efecto tal incluyen factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina-1 beta o interferón gamma.

- 10 En un aspecto, el ligando es un lípido o molécula basada en lípido. Un lípido o molécula basada en lípido tal se une preferentemente a proteína del suero, por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA). Un ligando que se une a HSA permite la distribución del conjugado a un tejido diana, por ejemplo, un tejido diana no de riñón del cuerpo. Por ejemplo, el tejido diana puede ser el hígado, que incluye células del parénquima del hígado. Otras moléculas que pueden unirse a HSA también pueden usarse como ligandos. Por ejemplo, pueden usarse naproxeno o aspirina. Un lípido o ligando basado en lípido puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar la elección de diana o transporte en una célula diana o membrana celular, y/o (c) puede usarse para ajustar la unión a una proteína del suero, por ejemplo, HSA.

Un ligando basado en lípido puede usarse para modular, por ejemplo, controlar la unión del conjugado a un tejido diana. Por ejemplo, será menos probable que un lípido o ligando basado en lípido que se une a HSA más fuertemente se dirija al riñón y, por tanto, será menos probable que sea eliminado del cuerpo. Puede usarse un ligando de lípido o basado en lípido que se une a HSA menos fuertemente para dirigir el conjugado al riñón.

- 20 En una implementación preferida, el ligando basado en lípido se une a HSA. Preferentemente, se une a HSA con una afinidad suficiente de forma que el conjugado se distribuya preferentemente a un tejido no de riñón. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte que la unión HSA-ligando no pueda invertirse.

- 25 En otra realización preferida, el ligando basado en lípido se une a HSA débilmente o no se une en absoluto, de forma que el conjugado se distribuirá preferentemente en el riñón. También pueden usarse otros restos que se dirigen a las células del riñón en lugar de o además del ligando basado en lípido.

- 30 En otro aspecto, el ligando es un resto, por ejemplo, una vitamina, que es captada por una célula diana, por ejemplo, una célula proliferante. Éstas son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por proliferación celular no deseada, por ejemplo, de tipo maligno o no maligno, por ejemplo, células cancerosas. Vitaminas a modo de ejemplo incluyen vitamina A, E y K. Otras vitaminas a modo de ejemplo incluyen vitaminas B, por ejemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes captados por células cancerosas. También se incluyen HAS, lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL).

- 35 En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación celular, preferentemente un agente de permeación celular helicoidal. Preferentemente, el agente es anfipático. Un agente a modo de ejemplo es un péptido tal como tat o Antennopodia. Si el agente es un péptido, puede modificarse, que incluye un peptidomimético, invertómeros, enlaces no peptídicos o pseudo-peptídicos, y el uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal es preferentemente un agente helicoidal alfa, que preferentemente tiene una fase lipófila y una lipófoba.

- 40 El ligando puede ser un péptido o peptidomimético. Un peptidomimético (también denominado en el presente documento un oligopeptidomimético) es una molécula capaz de plegarse en una estructura tridimensional definida similar a un péptido natural. El resto de péptido o peptidomimético puede tener aproximadamente 5-50 aminoácidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de longitud. Un péptido o peptidomimético puede ser, por ejemplo, un péptido de permeación celular, péptido catiónico, péptido anfipático o péptido hidrófobo (por ejemplo, que consiste principalmente de Tyr, Trp o Phe). El resto de péptido puede ser un péptido dendrímero, péptido limitado o péptido reticulado. En otra alternativa, el resto de péptido puede incluir una secuencia de translocación de la membrana hidrófoba (MTS). Un péptido que contiene MTS hidrófoba a modo de ejemplo es RFGF que tiene la secuencia de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 29). Un análogo de RFGF (por ejemplo, secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 30)) que contiene una MTS hidrófoba también puede ser un resto que elige diana. El resto de péptido puede ser un péptido de "administración", que puede llevar grandes moléculas polares que incluyen péptidos, oligonucleótidos y proteína a través de las membranas celulares. Por ejemplo, se ha encontrado que las secuencias de la proteína Tat del VIH (GRKKRRQRRPPQ (SEQ ID NO: 31)) y la proteína Antennapedia de *Drosophila* (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 32)) pueden funcionar como péptidos de administración. Un péptido o peptidomimético puede codificarse por una secuencia de ADN aleatoria, tal como un péptido identificado de una biblioteca de expresión en fago, o biblioteca combinatoria de una perla-un compuesto (OBOC) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991).
- 50 Preferentemente, el péptido o peptidomimético anclado a un agente de ARNi mediante una unidad de monómero incorporada es un péptido que elige como diana una célula tal como un péptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), o mimético RGD. Un resto de péptido puede oscilar en longitud de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos. Los restos de péptido pueden tener una modificación estructural, tal como para aumentar la estabilidad o dirigir propiedades conformacionales. Puede utilizarse cualquiera de las modificaciones estructurales descritas más adelante. Puede usarse un resto de péptido RGD para elegir como diana una célula

tumoral, tal como una célula tumoral endotelial o una célula tumoral de cáncer de mama (Zitzmann et al., Cancer Res., 62:5139-43, 2002). Un péptido RGD puede facilitar dirigir un agente de ARNi a tumores de una variedad de otros tejidos, que incluyen el pulmón, riñón, bazo o hígado (Aoki et al., Cancer Gene Therapy 8:783-787, 2001). Preferentemente, el péptido RGD facilitará el dirigir un agente de ARNi al riñón. El péptido RGD puede ser lineal o cíclico, y puede modificarse, por ejemplo, glucosilarse o metilarse para facilitar el ser dirigido a tejidos específicos. Por ejemplo, un péptido RGD glucosilado puede administrar un agente de ARNi a una célula tumoral que expresa $\alpha v \beta_3$ (Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42:326-336, 2001). Pueden usarse péptidos que eligen como diana marcadores enriquecidos en células proliferantes. Por ejemplo, los péptidos y peptidomiméticos que contienen RGD pueden dirigirse a células cancerosas, en particular células que presentan una integrina. Así, podrían usarse péptidos RGD, péptidos cíclicos que contienen RGD, péptidos RGD que incluyen D-aminoácidos, además de miméticos de RGD sintéticos. Además de RGD, pueden usarse otros restos que eligen como diana el ligando de integrina. Generalmente, tales ligandos pueden usarse para controlar las células proliferantes y la angiogénesis. Conjugados preferidos de este tipo de ligando eligen como diana PECAM-1, VEGF, u otro gen de cáncer, por ejemplo, un gen de cáncer descrito en el presente documento.

Un "péptido de permeación celular" puede permear en una célula, por ejemplo, una célula microbiana, tal como una célula bacteriana o fúngica, o una célula de mamífero, tal como una célula humana. Un péptido de permeación en células microbianas puede ser, por ejemplo, un péptido lineal α -helicoidal (por ejemplo, LL-37 o Ceropin P1), un péptido que contiene enlace disulfuro (por ejemplo, α -defensina, β -defensina o batenecina), o un péptido que contiene solo uno o dos aminoácidos dominantes (por ejemplo, PR-39 o indolicidina). Un péptido de permeación celular también puede incluir una señal de localización nuclear (NLS). Por ejemplo, un péptido de permeación celular puede ser un péptido anfipático bipartito, tal como MPG, que se deriva del dominio del péptido de fusión de gp41 del VIH-1 y NLS del antígeno T grande del SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

En una realización, un péptido que elige diana puede ser un péptido α -helicoidal anfipático. Péptidos α -helicoidales anfipáticos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cecropinas, licotoxinas, paradaxinas, buforina, CPF, péptido similar a bombinina (BLP), catelicidinas, ceratotoxinas, péptidos de *S. clava*, péptidos antimicrobianos intestinales de pez bruja (HFIAP), magaininas, brevininas-2, dermaseptinas, melitinas, pleurocidina, péptidos de H_2A , péptidos de *Xenopus*, esculentinas-1 y caerinas. Se considerarán preferentemente varios factores para mantener la integridad de la estabilidad de la hélice. Por ejemplo, se utilizará un número máximo de residuos de estabilización de la hélice (por ejemplo, leu, ala o lys) y se utilizará un número mínimo de residuos de desestabilización de la hélice (por ejemplo, prolina, o unidades monoméricas cíclicas. Se considerará el residuo de encapuchado (por ejemplo, Gly es un residuo de encapuchado de N a modo de ejemplo y/o puede usarse amidación del extremo C para proporcionar un enlace de H adicional para estabilizar la hélice. La formación de puentes salinos entre residuos con cargas opuestas, separadas por $i \pm 3$, o $i \pm 4$ posiciones, puede proporcionar estabilidad. Por ejemplo, residuos catiónicos tales como lisina, arginina, homo-arginina, ornitina o histidina pueden formar puentes salinos con los residuos aniónicos glutamato o aspartato.

Ligandos de péptido y peptidomimético incluyen aquellos que tienen péptidos que se producen naturalmente o modificados, por ejemplo, péptidos D o L; péptidos α , β o γ ; N-metilpéptidos; azapéptidos; péptidos que tienen uno o más enlaces amida, es decir, peptídicos, sustituidos con uno o más enlaces urea, tiourea, carbamato o sulfonilurea; o péptidos cíclicos.

El ligando que elige diana puede ser cualquier ligando que pueda dirigirse a un receptor específico. Ejemplos son: folato, GalNAc, galactosa, manosa, manosa-6P, agrupaciones de azúcares tales como agrupación de GalNAc, agrupación de manosa, agrupación de galactosa o un aptámero. Una agrupación es una combinación de dos o más unidades de azúcar. Los ligandos que eligen diana también incluyen ligandos de receptor de integrina, ligandos de receptor de quimiocina, transferrina, biotina, ligandos de receptor de serotonina, PSMA, endotelina, GCPII, somatostatina, ligandos de LDL y HDL. Los ligandos también pueden basarse en ácido nucleico, por ejemplo, un aptámero. El aptámero puede estar sin modificar o tener cualquier combinación de modificaciones desveladas en el presente documento.

Los agentes de liberación endosómica incluyen imidazoles, poli u oligoimidazoles, PEI, péptidos, péptidos fusogénicos, policaboxilatos, policationes, oligo o policationes o aniones enmascarados, acetales, poliacetales, cetales/policetales, ortoésteres, polímeros con cargas catiónicas o aniónicas enmascaradas o desenmascaradas, dendrímeros con cargas catiónicas o aniónicas enmascaradas o desenmascaradas.

Modulador PC representa modulador farmacocinético. Moduladores PC incluyen lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípidos, péptidos, agentes de unión a proteínas, PEG, vitaminas, etc. Moduladores PC a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, colesterol, ácidos grasos, ácido cólico, ácido litocólico, dialquilglicéridos, diacilglicérido, fosfolípidos, esfingolípidos, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina, etc. Los oligonucleótidos que comprenden varios enlaces fosforotioato también son conocidos por unirse a proteína del suero, así, oligonucleótidos cortos, por ejemplo, oligonucleótidos de aproximadamente 5 bases, 10 bases, 15 bases o 20 bases, que comprenden múltiples enlaces fosforotioato en el esqueleto también son aceptados para la presente invención como ligandos (por ejemplo, como agentes de modulación PC).

Además, los aptámeros que se unen a componentes del suero (por ejemplo, proteínas del suero) también son aceptados para la presente invención como ligandos moduladores PC.

Otros conjugados de ligando aceptados por la invención se describen en las solicitudes de patente de EE.UU. USSN: 10/916.185, presentada el 10 de agosto de 2004; USSN: 10/946.873, presentada el 21 de septiembre de 2004; USSN: 10/833.934, presentada el 3 de agosto de 2007; USSN: 11/115.989 presentada el 27 de abril de 2005 y USSN: 11/944.227 presentada el 21 de noviembre de 2007.

Si dos o más ligandos están presentes, los ligandos pueden todos tener las mismas propiedades, todos tener propiedades diferentes, o algunos ligandos tienen las mismas propiedades mientras que otros tienen propiedades diferentes. Por ejemplo, un ligando puede tener propiedades de elección de diana, tener actividad endosomolítica o tener propiedades de modulación PC. En una realización preferida, todos los ligandos tienen propiedades diferentes.

Los ligandos pueden acoplarse a los oligonucleótidos en diversos sitios, por ejemplo, extremo 3', extremo 5', y/o en una posición interna. En realizaciones preferidas, el ligando está unido a los oligonucleótidos mediante un anclaje intermedio, por ejemplo, un vehículo descrito en el presente documento. El ligando o ligando anclado puede estar presente en un monómero cuando el monómero se incorpora en la hebra en crecimiento. En algunas realizaciones, el ligando puede incorporarse mediante acoplamiento con un monómero "precursor" después de que el monómero "precursor" se haya incorporado en la hebra en crecimiento. Por ejemplo, un monómero que tiene, por ejemplo, un anclaje terminado en amino (es decir, que no tiene ligando asociado), por ejemplo, $\text{TAP}-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ puede incorporarse en una hebra de oligonucleótido en crecimiento. En una operación posterior, es decir, después de la incorporación del monómero precursor en la hebra, un ligando que tiene un grupo electrófilo, por ejemplo, un grupo éster pentafluorofenílico o aldehído, puede unirse posteriormente al monómero precursor acoplando el grupo electrófilo del ligando al grupo nucleófilo terminal del anclaje del monómero precursor.

En otro ejemplo, puede incorporarse un monómero que tiene un grupo químico adecuado para tomar parte en la reacción de química de Click, por ejemplo, un anclaje/conector terminado en azida o alquino. En una operación posterior, es decir, después de la incorporación del monómero precursor en la hebra, un ligando que tiene grupo químico complementario, por ejemplo, un alquino o azida puede unirse al monómero precursor acoplando juntos el alquino y la azida.

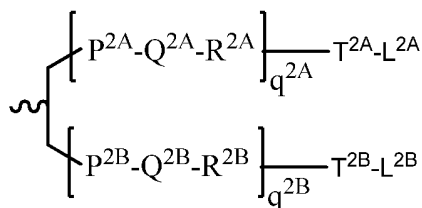
Para oligonucleótidos bicatenarios, los ligandos pueden unirse a una o ambas hebras. En algunas realizaciones, un agente de ARNi bicatenario contiene un ligando conjugado con la hebra codificante. En otras realizaciones, un agente de ARNi bicatenario contiene un ligando conjugado con la hebra no codificante.

En algunas realizaciones, el ligando puede conjugarse con nucleobases, restos de azúcar o enlaces internucleosídicos de moléculas de ácidos nucleicos. La conjugación con nucleobases de purina o derivados de la misma puede producirse en cualquier posición que incluye, átomos endocíclicos y exocíclicos. En algunas realizaciones, las posiciones 2, 6, 7 u 8 de una nucleobase de purina están unidas a un resto de conjugado. La conjugación con nucleobases de pirimidina o derivados de la misma también puede producirse en cualquier posición. En algunas realizaciones, las posiciones 2, 5 y 6 de una nucleobase de pirimidina pueden estar sustituidas con un resto de conjugado. La conjugación con restos de azúcar de nucleósidos puede producirse en cualquier átomo de carbono. Átomos de carbono de ejemplo de un resto de azúcar que puede unirse a un resto de conjugado incluyen los átomos de carbono 2', 3' y 5'. La posición 1' también puede unirse a un resto de conjugado, tal como en un residuo abásico. Los enlaces internucleosídicos también pueden llevar restos de conjugado. Para enlaces que contienen fósforo (por ejemplo, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, fosforoamidato y similares), el resto de conjugado puede unirse directamente al átomo de fósforo o a un átomo de O, N o S unido al átomo de fósforo. Para enlaces internucleosídicos que contienen amina o amida (por ejemplo, PNA), el resto de conjugado puede unirse al átomo de nitrógeno de la amina o amida o a un átomo de carbono adyacente.

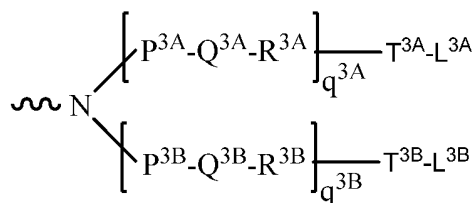
Puede usarse cualquier ligando adecuado en el campo de la interferencia por ARN, aunque el ligando normalmente es un hidrato de carbono, por ejemplo, monosacárido (tal como GalNAc), disacárido, trisacárido, tetrasacárido, polisacárido.

Conectores que conjugan el ligando con el ácido nucleico incluyen aquellos tratados anteriormente. Por ejemplo, el ligando puede ser uno o más derivados de GalNAc (*N*-acetilglucosamina) unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente.

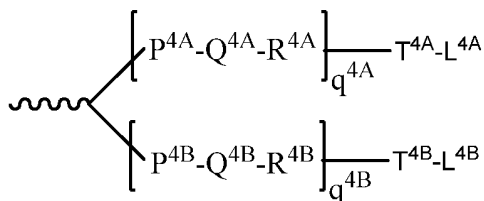
En una realización, el ARNbc de la invención está conjugado con un conector ramificado bivalente y trivalente que incluye las estructuras mostradas en cualquiera de las fórmulas (IV) – (VII):



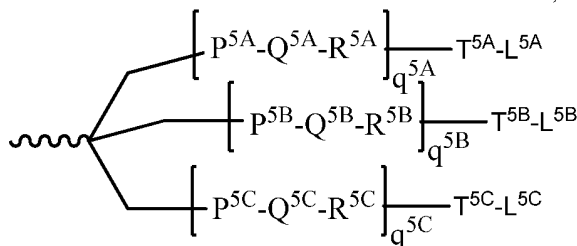
Fórmula (IV)



Fórmula (V)



Fórmula (VI)



Fórmula (VII)

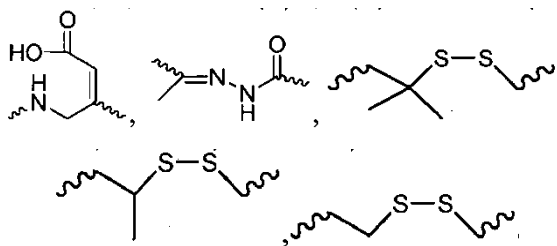
en las que:

$\text{q}^{2\text{A}}, \text{q}^{2\text{B}}, \text{q}^{3\text{A}}, \text{q}^{3\text{B}}, \text{q}^{4\text{A}}, \text{q}^{4\text{B}}, \text{q}^{5\text{A}}, \text{q}^{5\text{B}}$ y $\text{q}^{5\text{C}}$ representan independientemente para cada aparición 0-20 y en los que la unidad de repetición puede ser igual o diferente;

5 $\text{P}^{2\text{A}}, \text{P}^{2\text{B}}, \text{P}^{3\text{A}}, \text{P}^{3\text{B}}, \text{P}^{4\text{A}}, \text{P}^{4\text{B}}, \text{P}^{5\text{A}}, \text{P}^{5\text{B}}, \text{P}^{5\text{C}}, \text{T}^{2\text{A}}, \text{T}^{2\text{B}}, \text{T}^{3\text{A}}, \text{T}^{3\text{B}}, \text{T}^{4\text{A}}, \text{T}^{4\text{B}}, \text{T}^{5\text{A}}, \text{T}^{5\text{B}}, \text{T}^{5\text{C}}$ están cada uno independientemente para cada aparición ausentes, son CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH o CH₂O;

$\text{Q}^{2\text{A}}, \text{Q}^{2\text{B}}, \text{Q}^{3\text{A}}, \text{Q}^{3\text{B}}, \text{Q}^{4\text{A}}, \text{Q}^{4\text{B}}, \text{Q}^{5\text{A}}, \text{Q}^{5\text{B}}, \text{Q}^{5\text{C}}$ están independientemente para cada aparición ausentes, son alquileo, alquileo sustituido en los que uno o más metilenos pueden interrumpirse o terminarse con uno o más de O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C o C(O);

10 $\text{R}^{2\text{A}}, \text{R}^{2\text{B}}, \text{R}^{3\text{A}}, \text{R}^{3\text{B}}, \text{R}^{4\text{A}}, \text{R}^{4\text{B}}, \text{R}^{5\text{A}}, \text{R}^{5\text{B}}, \text{R}^{5\text{C}}$ están cada uno independientemente para cada aparición ausentes, son NH, O, S, CH₂ C(O)O, CONH NHCH(R^a)C(O), -CO-CHR^a-NH-, CO, CH=N-O,

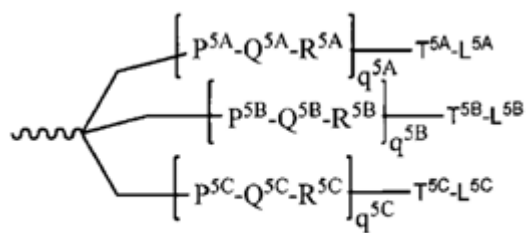


o heterociclilo;

15 $\text{L}^{2\text{A}}, \text{L}^{2\text{B}}, \text{L}^{3\text{A}}, \text{L}^{3\text{B}}, \text{L}^{4\text{A}}, \text{L}^{4\text{B}}, \text{L}^{5\text{A}}, \text{L}^{5\text{B}}$ y $\text{L}^{5\text{C}}$ representan el ligando; es decir, cada uno independientemente para cada aparición un monosacárido (tal como GalNAc), disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido o polisacárido; y

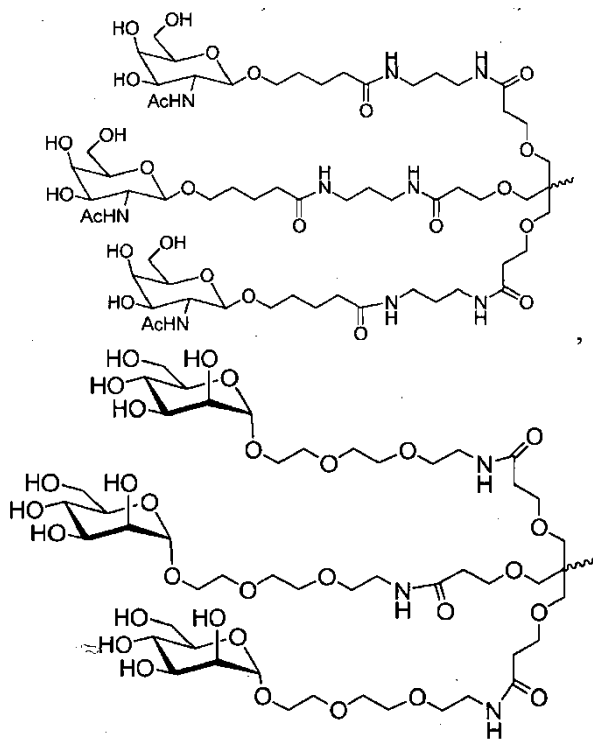
R^a es H o cadena lateral de aminoácido.

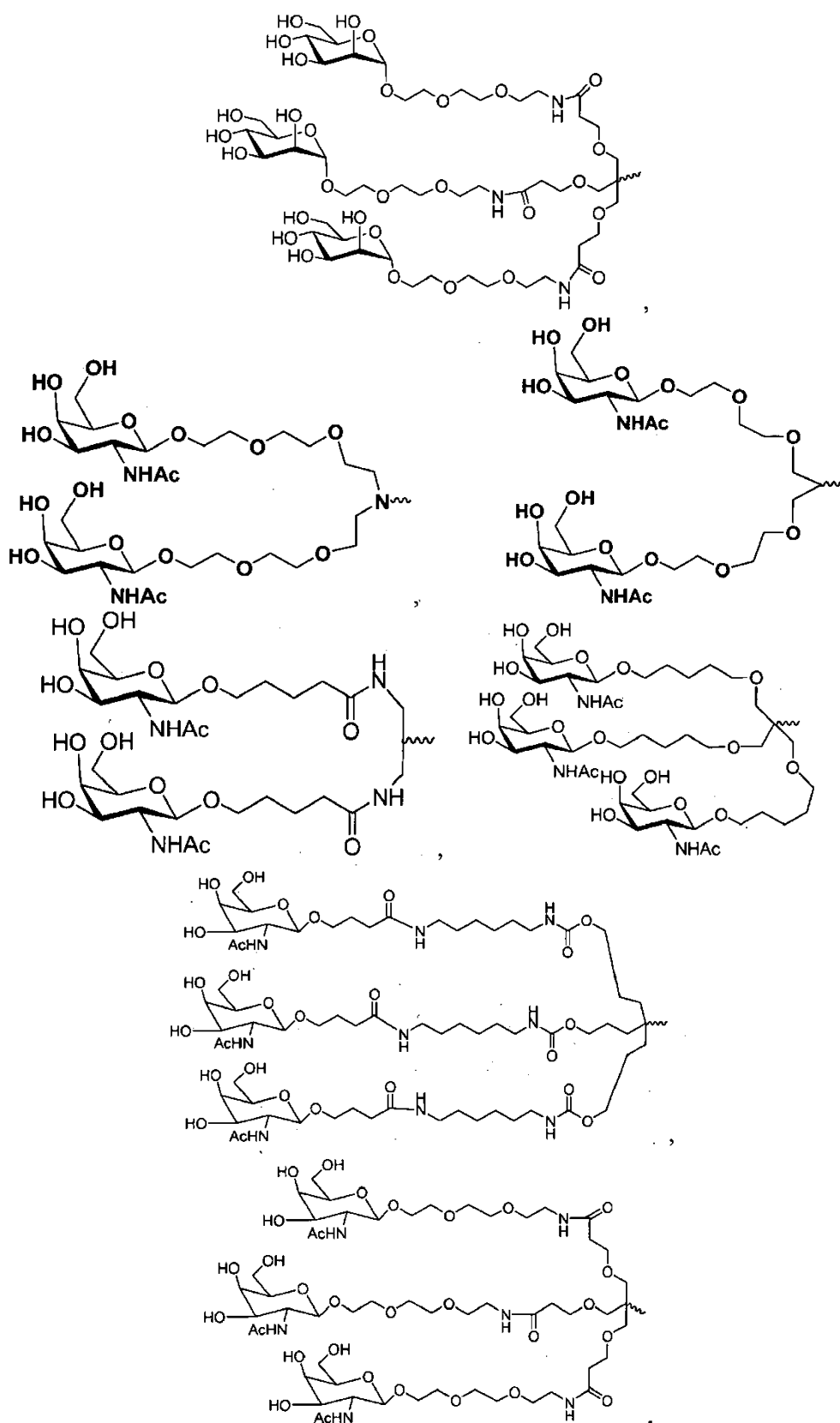
20 Los derivados de GalNAc de conjugación trivalentes son particularmente útiles para su uso con agentes de iARN para inhibir la expresión de un gen diana, tal como aquellos de fórmula (VII):

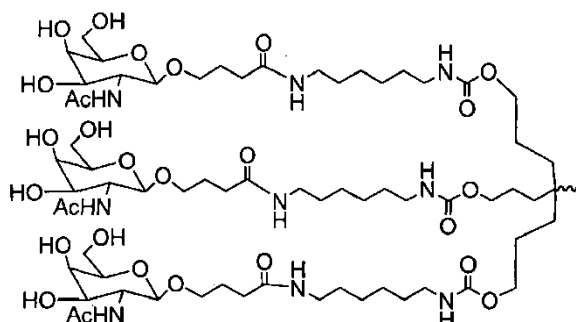


Fórmula (VII)

en la que L^{5A} , L^{5B} y L^{5C} representan un monosacárido, tal como derivado de GalNAc. Ejemplos de grupos conectores ramificados bivalentes y trivalentes adecuados que se conjugan con derivados de GalNAc incluyen, pero no se limitan a, los siguientes compuestos:







Patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de conjugados de ARN incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941; 6.294.664; 6.320.017; 6.576.752; 6.783.931; 6.900.297; 7.037.646; 8.106.022.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado estén uniformemente modificadas, y de hecho más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas puede incorporarse en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un ARNi. La presente invención también incluye compuestos de ARNi que son compuestos químicos.

Compuestos de ARNi "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de la presente invención, son compuestos de ARNi, preferentemente ARNbc, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una constituida de al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de ARNbc. Estos ARNi normalmente contienen al menos una región en la que el ARN se modifica para conferir al ARNi elevada resistencia a la degradación por nucleasas, elevada captación celular y/o elevada afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Una región adicional del ARNi puede servir de sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de RNasa H, por tanto, produce la escisión de la diana de ARN, potenciando así enormemente la eficiencia de inhibición por ARNi de la expresión génica. Por consiguiente, frecuentemente pueden obtenerse resultados comparables con ARNi cortos cuando se usan ARNbc quiméricos, en comparación con ARNbc de desoxi de fosforotioato que se hibridan con la misma región diana. La escisión de la diana de ARN puede ser rutinariamente detectada por electroforesis en gel y, si fuera necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica.

En ciertos casos, el ARN de un ARNi puede modificarse por un grupo no de ligando. Se han conjugado varias moléculas no de ligando con ARNi con el fin de potenciar la actividad, distribución celular o captación celular del ARNi, y procedimientos para realizar tales conjugaciones están disponibles en la bibliografía científica. Tales restos no de ligando tienen incluidos restos de lípido, tales como colesterol (Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), un tiocolesterol (Oberhauer et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), una cadena alifática, por ejemplo, restos dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), o ácido adamantanoacético (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), un resto palmitilo (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales conjugados de ARN han sido enumeradas anteriormente. Protocolos de conjugación típicos implican la síntesis de un ARN que lleva un conector amino en una o más posiciones de la secuencia. El grupo amino se hace reaccionar entonces con la molécula que se conjuga usando reactivos de acoplamiento o activantes apropiados. La reacción de conjugación puede realizarse ya sea con el ARN todavía unido al soporte sólido o tras la escisión del ARN, en fase de disolución. La purificación del conjugado de ARN por HPLC normalmente proporciona el conjugado puro.

El agente de iARN bicatenario de la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en AD-58681, AD-59054, AD-61719 y AD-61444.

III. Administración de un ARNi de la invención

La administración de un agente de ARNi de la invención a una célula, por ejemplo, una célula dentro de un sujeto, tal como un sujeto humano (por ejemplo, un sujeto en necesidad del mismo, tal como un sujeto que tiene un trastorno asociado a la deficiencia de Serpina1, por ejemplo, un trastorno del hígado de deficiencia de Serpina1) puede lograrse de varias formas diferentes. Por ejemplo, la administración puede realizarse poniendo en contacto una célula con un ARNi de la invención tanto *in vitro* como *in vivo*. La administración *in vivo* también puede realizarse directamente administrando una composición que comprende un ARNi, por ejemplo, un ARNbc, a un sujeto. Alternativamente, la administración *in vivo* puede realizarse indirectamente administrando uno o más vectores que codifican y dirigen la expresión del ARNi. Estas alternativas se tratan adicionalmente más adelante.

En general, puede adaptarse cualquier método de administración de una molécula de ácido nucleico (*in vitro* o *in vivo*) para su uso con un ARNi de la invención (véase, por ejemplo, Akhtar S. y Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144 y el documento WO94/02595, que se incorporan en el presente documento por referencia en sus totalidades). Para administración *in vivo*, factores a considerar con el fin de administrar una molécula de ARNi incluyen, por ejemplo, estabilidad biológica de la molécula administrada, prevención de efectos no específicos y acumulación de la molécula administrada en el tejido diana. Los efectos no específicos de un ARNi pueden minimizarse por administración local, por ejemplo, por inyección directa o implantación en un tejido o administrando tópicamente la preparación. La administración local a un sitio de tratamiento maximiza la concentración local del agente, limita la exposición del agente a tejidos sistémicos que pueden de otro modo ser dañados por el agente o que pueden degradar el agente, y permite administrar una menor dosis total de la molécula de ARNi. Varios estudios han mostrado la inactivación satisfactoria de productos génicos cuando se administra localmente un ARNi. Por ejemplo, se mostró que la administración intraocular de un ARNbc de VEGF por inyección intravítrea en monos cinomolgos (Tolentino, MJ., et al. (2004) Retina 24:132-138) e inyecciones subretinianas en ratones (Reich, SJ., et al. (2003) Mol. Vis. 9:210-216) previnieron ambas la neovascularización en un modelo experimental de degeneración macular senil. Además, la inyección intratumoral directa de un ARNbc en ratones reduce el volumen del tumor (Pille, J., et al. (2005) Mol. Ther. 11:267-274) y puede prolongar la supervivencia de ratones portadores de tumor (Kim, WJ., et al. (2006) Mol. Ther. 14:343-350; Li, S., et al. (2007) Mol. Ther. 15:515-523). La interferencia por ARN también ha mostrado éxito con la administración local al SNC por inyección directa (Dorn, G., et al. (2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan, PH., et al. (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H., et al. (2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, GT., et al. (2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker, ER., et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al. (2005) J. Neurophysiol. 93:594-602) y a los pulmones por administración intranasal (Howard, KA., et al. (2006) Mol. Ther. 14:476-484; Zhang, X., et al. (2004) J. Biol. Chem. 279:10677-10684; Bitko, V., et al. (2005) Nat. Med. 11:50-55). Para administrar un ARNi sistémicamente para el tratamiento de una enfermedad, el ARN puede modificarse o alternativamente administrarse usando un sistema de administración de fármacos; ambos métodos actúan previniendo la rápida degradación del ARNbc por endo- y exo-nucleasas *in vivo*. La modificación del ARN o el vehículo farmacéutico también puede dirigir la composición de ARNi al tejido diana y evitar efectos inespecíficos no deseables. Las moléculas de ARNi pueden modificarse por conjugación química con grupos lipófilos tales como colesterol para potenciar la captación celular y prevenir la degradación. Por ejemplo, se inyectó un ARNi dirigido contra ApoB conjugado con un resto de colesterol lipófilo sistémicamente en ratones y produjo la inactivación del ARNm de apoB en tanto el hígado como el yeyuno (Soutschek, J., et al. (2004) Nature 432:173-178). Se ha mostrado que la conjugación de un ARNi con un aptámero inhibe el crecimiento tumoral y media en la regresión tumoral en un modelo de ratón de cáncer de próstata (McNamara, JO., et al. (2006) Nat. Biotechnol. 24:1005-1015). En una realización alternativa, el ARNi puede administrarse usando sistemas de administración de fármacos tales como una nanopartícula, un dendrímero, un polímero, liposomas o un sistema de administración catiónica. Los sistemas de administración catiónica positivamente cargados facilitan la unión de una molécula de ARNi (negativamente cargada) y también potencian interacciones en la membrana celular negativamente cargada para permitir la eficaz captación de un ARNi por la célula. Lípidos catiónicos, dendrímeros o polímeros pueden tanto unirse a un ARNi, como ser inducidos para formar una vesícula o micela (véase, por ejemplo, Kim SH., et al. (2008) Journal of Controlled Release 129(2):107-116) que reviste un ARNi. La formación de vesículas o micelas previene adicionalmente la degradación del ARNi cuando se administra sistémicamente. Métodos de preparación y administración de complejos catiónicos de ARNi están perfectamente dentro de las capacidades de un experto en la materia (véanse, por ejemplo, Sorensen, DR., et al. (2003) J. Mol. Biol. 327:761-766; Verma, UN., et al. (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300; Arnold, AS et al. (2007) J. Hypertens. 25:197-205, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad). Algunos ejemplos no limitantes de sistemas de administración de fármacos útiles para la administración sistémico de ARNi incluyen DOTAP (Sorensen, DR., et al. (2003), arriba; Verma, UN., et al. (2003), arriba), Oligofectamine, "partículas lipídicas de ácidos nucleicos sólidos" (Zimmermann, TS., et al. (2006) Nature 441:111-114), cardiolipina (Chien, PY., et al. (2005) Cancer Gene Ther. 12:321-328; Pal, A., et al. (2005) Int J. Oncol. 26:1087-1091), polietilenimina (Bonnet ME., et al. (2008) Pharm. Res. Aug 16 Publicación electrónica antes de la impresión; Aigner, A. (2006) J. Biomed. Biotechnol. 71659), péptidos Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) Mol. Pharm. 3:472-487) y poliamidoaminas (Tomalia, DA., et al. (2007) Biochem. Soc. Trans. 35:61-67; Yoo, H., et al. (1999) Pharm. Res. 16:1799-1804). En algunas realizaciones, un ARNi forma un complejo con ciclodextrina para administración sistémica. Métodos para administración y composiciones farmacéuticas de ARNi y ciclodextrinas pueden encontrarse en la patente de EE.UU. N.º 7.427.605.

A. ARNi codificados por vector

El ARNi dirigido al gen *Serpina1* puede expresarse de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN (véanse, por ejemplo, Couture, A., et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., publicación PCT internacional N.º WO 00/22113, Conrad, publicación PCT internacional N.º WO 00/22114, y Conrad, patente de EE.UU. N.º 6,054,299). La expresión puede ser transitoria (en el orden de horas a semanas) o sostenida (semanas a meses o más), dependiendo de la construcción específica usada y el tejido diana o tipo de célula. Estos transgenes pueden introducirse como una construcción lineal, un plásmido circular o un vector viral, que puede ser un vector integrante o no integrante. El transgén también puede construirse para permitir que sea heredado como un plásmido extracromosómico (Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292).

La hebra o hebras individuales de un ARNi pueden transcribirse de un promotor en un vector de expresión. Si van a expresarse dos hebras separadas para generar, por ejemplo, un ARNbc, dos vectores de expresión separados pueden co-introducirse (por ejemplo, por transfección o infección) en una célula diana. Alternativamente, cada hebra individual de un ARNbc puede transcribirse por promotores ambos de los cuales están localizados sobre el mismo plásmido de expresión. En una realización, un ARNbc se expresa como polinucleótidos de repetición invertida unidos por una secuencia de polinucleótidos conectora de forma que el ARNbc tenga una estructura de tallo y bucle.

Los vectores de expresión de ARNi son generalmente plásmidos de ADN o vectores virales. Pueden usarse vectores de expresión compatibles con células eucariotas, preferentemente aquellos compatibles con células de vertebrado, para producir construcciones recombinantes para la expresión de un ARNi como se describe en el presente documento. Los vectores de expresión en células eucariotas son muy conocidos en la técnica y están disponibles de varias fuentes comerciales. Normalmente, se proporcionan vectores tales que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción del segmento de ácido nucleico deseado. La administración de vectores que expresan ARNi puede ser sistémica, tal como por administración intravenosa o intramuscular, por administración a células diana explantadas del paciente, seguido de reintroducción en el paciente, o por cualquier otro medio que permita la introducción en una célula diana deseada.

Los plásmidos de expresión de ARNi pueden transfectarse en células diana como un complejo con vehículos de lípidos catiónicos (por ejemplo, Oligofectamine) o vehículos basados en lípidos no catiónicos (por ejemplo, Transit-TMTKO). La invención también contempla múltiples transfecciones de lípidos para inactivaciones mediadas por ARNi dirigidas a diferentes regiones de un ARN diana durante un periodo de una semana o más. La satisfactoria introducción de vectores en células huésped puede monitorizarse usando diversos métodos conocidos. Por ejemplo, la transfección transitoria puede señalizarse con un indicador, tal como un marcador fluorescente, tal como proteína verde fluorescente (GFP). La transfección estable de células *ex vivo* puede garantizarse usando marcadores que proveen la célula transfectada de resistencia a factores medioambientales específicos (por ejemplo, antibióticos y fármacos), tales como resistencia a higromicina B.

Sistemas de vectores virales que pueden utilizarse con los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, (a) vectores de adenovirus; (b) vectores de retrovirus, que incluyen, pero no se limitan a, vectores lentivirales, virus de la leucemia murina de Moloney, etc.; (c) vectores de virus adeno-asociados; (d) vectores del virus del herpes simple; (e) vectores del SV 40; (f) vectores del virus del poliovirus; (g) vectores del virus del papiloma; (h) vectores de picornavirus; (i) vectores del virus de la viruela tales como un ortopox, por ejemplo, vectores del virus de la variolovacuna o avipox, por ejemplo, viruela del canario o viruela aviar; y (j) un adenovirus dependiente de colaborador o de Gutless. También pueden ser ventajosos virus defectuosos en la replicación. Diferentes vectores se incorporarán o no se incorporarán en el genoma de las células. Las construcciones pueden incluir secuencias virales para la transfección, si se desea. Alternativamente, la construcción puede incorporarse en vectores capaces de replicación episómica, por ejemplo, vectores de EPV y EBV. Las construcciones para la expresión recombinante de un ARNi generalmente requerirán elementos reguladores, por ejemplo, promotores, potenciadores, etc., para garantizar la expresión del ARNi en células diana. Otros aspectos a considerar para los vectores y construcciones se describen adicionalmente más adelante.

Vectores útiles para la administración de un ARNi incluirán elementos reguladores (promotor, potenciador, etc.) suficientes para la expresión del ARNi en la célula o tejido diana deseado. Los elementos reguladores pueden elegirse para proporcionar tanto expresión constitutiva como regulada/inducible.

La expresión del ARNi puede regularse con precisión, por ejemplo, usando una secuencia reguladora inducible que es sensible a ciertos reguladores fisiológicos, por ejemplo, niveles de glucosa circulante, u hormonas (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24). Tales sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión de ARNbc en células o en mamíferos incluyen, por ejemplo, regulación por ecdisona, por estrógeno, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de la dimerización e isopropil-beta-D1-tiogalactopiranosido (IPTG). Un experto en la materia sería capaz de elegir la secuencia reguladora/ promotor apropiada basándose en el uso previsto del transgén de ARNi.

Pueden usarse vectores virales que contienen secuencias de ácidos nucleicos que codifican un ARNi. Por ejemplo, puede usarse un vector retroviral (véase Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para la correcta encapsidación del genoma viral e integración en

el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican un ARNi se clonan en uno o más vectores, que facilitan la administración del ácido nucleico en un paciente. Más detalles sobre vectores retrovirales pueden encontrarse, por ejemplo, en Boesen et al., *Biotherapy* 6:291-302 (1994), que describe el uso de un vector retroviral para administrar el gen *mdrl* a citoblastos hematopoyéticos con el fin de hacer los citoblastos más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes et al., *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994); Kiem et al., *Blood* 83:1467-1473 (1994); Salmons y Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); y Grossman y Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993). Vectores lentivirales contemplados para su uso incluyen, por ejemplo, los vectores basados en el VIH descritos en las patentes de EE.UU. N.º 6.143.520; 5.665.557; y 5.981.276, que se incorporan en el presente documento por referencia.

También se contemplan adenovirus para su uso en la administración de ARNi de la invención. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos, por ejemplo, para administrar genes a epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan naturalmente epitelios respiratorios en los que producen una leve enfermedad. Otras dianas para los sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se dividen. Kozarsky y Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout et al., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios en monos rhesus. Otros ejemplos del uso de adenovirus en terapia génica pueden encontrarse en Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); publicación PCT WO94/12649; y Wang, et al., *Gene Therapy* 2:775-783 (1995). Un vector de AV adecuado para expresar un ARNi caracterizado en la invención, un método para construir el vector de AV recombinante y un método para administrar el vector en células diana se describen en Xia H et al. (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010.

También pueden usarse vectores de virus adeno-asociados (AAV) para la administración de un ARNi de la invención (Walsh et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993); patente de EE.UU. N.º 5.436.146). En una realización, el ARNi puede expresarse como dos moléculas de ARN monocatenario complementarias separadas de un vector de AAV recombinante que tiene, por ejemplo, tanto los promotores del ARN U6 o HI como el promotor del citomegalovirus (CMV). Vectores de AAV adecuados para expresar el ARNbc caracterizado en la invención, métodos para construir el vector de AV recombinante y métodos para administrar los vectores en células diana se describen en Samulski R et al. (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), *J. Virol.* 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; patente de EE.UU. N.º 5.252.479; patente de EE.UU. N.º 5.139.941; solicitud de patente internacional N.º WO 94/13788; y solicitud de patente internacional N.º WO 93/24641, cuyas divulgaciones enteras se incorporan en el presente documento por referencia.

Otro vector viral adecuado para la administración de un ARNi de la invención es un virus de la viruela tal como un virus de la variolovacuna, por ejemplo, una variolovacuna atenuada tal como el virus de Ankara modificado (MVA) o NYVAC, un avipox tal como la viruela aviar o la viruela del canario.

El tropismo de vectores virales puede modificarse pseudotipando los vectores con proteínas de la envuelta u otros antígenos de superficie de otros virus, o sustituyendo diferentes proteínas de la cápside viral, según convenga. Por ejemplo, pueden pseudotiparse vectores lentivirales con proteínas de la superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV), rabia, Ébola, Mokola y similares. Los vectores de AAV pueden prepararse para dirigirse a diferentes células manipulando por ingeniería los vectores para expresar diferentes serotipos de proteínas de la cápside; véanse, por ejemplo, Rabinowitz J E et al. (2002), *J Virol* 76:791-801.

La preparación farmacéutica de un vector puede incluir el vector en un diluyente aceptable, o puede incluir una matriz de liberación lenta en la que está incorporada el vehículo de administración del gen. Alternativamente, si el vector de administración del gen completo puede producirse intacto de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración del gen.

III. Composiciones farmacéuticas de la invención

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas que incluyen los ARNi de la invención. En una implementación, en el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen un ARNi, como se describe en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que contienen el ARNi son útiles para tratar una enfermedad o trastorno asociado a la expresión o actividad de un gen *Serpina1*, por ejemplo, un trastorno asociado a la deficiencia de *Serpina1*, por ejemplo, un trastorno del hígado de deficiencia de *Serpina1*. Tales composiciones farmacéuticas se formulan basándose en el modo de administración. Un ejemplo es composiciones que se formulan para administración sistémica mediante administración parenteral, por ejemplo, por administración intravenosa (IV). Otro ejemplo es composiciones que se formulan para administración directa en el parénquima cerebral, por ejemplo, por infusión en el cerebro, tal como por infusión con bomba continua.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden agentes de iARN de la invención pueden ser, por ejemplo, disoluciones con o sin un tampón, o composiciones que contienen vehículos farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones incluyen, por ejemplo, composiciones acuosas o cristalinas, formulaciones liposómicas, formulaciones micelares, emulsiones y vectores de terapia génica.

- 5 En el método descrito, el agente de iARN puede administrarse en una disolución. Un agente de iARN libre puede administrarse en una disolución no tamponada, por ejemplo, en solución salina o en agua. Alternativamente, el ARNip libre también puede administrarse en una disolución de tampón adecuada. La disolución de tampón puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato, o cualquier combinación de los mismos. En una realización preferida, la disolución de tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS). El pH y osmolaridad de la disolución de tampón que contiene el agente de iARN puede ajustarse de forma que sea adecuada para administración a un sujeto.

- 10 En algunas implementaciones, la disolución de tampón comprende además un agente para controlar la osmolaridad de la disolución, de forma que la osmolaridad se mantenga en un valor deseado, por ejemplo, a los valores fisiológicos del plasma humano. Solutos que puede añadirse a la disolución de tampón para controlar la osmolaridad incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, aminoácidos, polímeros no metabolizados, vitaminas, iones, azúcares, metabolitos, ácidos orgánicos, lípidos o sales. En algunas realizaciones, el agente para controlar la osmolaridad de la disolución es una sal. En ciertas realizaciones, el agente para controlar la osmolaridad de la disolución es cloruro sódico o cloruro de potasio.

- 20 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse en dosificaciones suficientes para inhibir la expresión de un gen *Serpina1*. En general, una dosis adecuada de un ARNi de la invención estará en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 200,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, generalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 50 mg por kilogramo de peso corporal por día. Por ejemplo, el ARNbc puede administrarse a aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg o aproximadamente 50 mg/kg por dosis única.

- 30 Por ejemplo, el agente de iARN, por ejemplo, ARNbc, puede administrarse a una dosis de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, o aproximadamente 10 mg/kg. Valores e intervalos intermedios a los valores citados también pretenden ser parte de la presente invención.

- En otra implementación, el agente de iARN, por ejemplo, ARNbc, se administra a una dosis de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 0,25 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 0,75 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 2 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 2,5 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 3 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 3,5 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 4 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 4,5 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 7,5 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 15 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 25 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 30 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 35 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 40 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 45 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 0,25 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 0,75 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 2 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 2,5 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 3 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 3,5 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 4 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 4,5 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 5 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 7,5 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 15 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 20 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 25 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 30 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 35 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 40 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 0,25 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 0,75 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 2 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 2,5 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 3 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 3,5 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 4 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 4,5 a

	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 7,5 a
	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 15 a
	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 20 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 20 a
	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 25 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 25 a
5	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 30 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 35 a
	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 0,25 a
	aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 0,75 a
	aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 1,5 a
	aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 2 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 2,5 a
10	aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 3 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 3,5 a
	aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 4 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 4,5 a
	aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 7,5 a
	aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 15 a
	aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 20 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 20 a
15	aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 25 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 0,1 a
	aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 0,25 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 0,5 a
	aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 0,75 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 1 a
	aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 2 a
	aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 2,5 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 3 a
20	aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 3,5 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 4 a
	aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 4,5 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 5 a
	aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 7,5 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 10 a
	aproximadamente 20 mg/kg, o aproximadamente 15 a aproximadamente 20 mg/kg. Valores e intervalos intermedios a los valores citados también pretenden ser parte de la presente invención.

25	Por ejemplo, el agente de iARN, por ejemplo, ARNbc, puede administrarse a una dosis de aproximadamente 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, o
30	aproximadamente 10 mg/kg. Valores e intervalos intermedios a los valores citados también pretenden ser parte de la presente divulgación.

	En otra implementación, el agente de iARN, por ejemplo, ARNbc, se administra a una dosis de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 0,75 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1 a
	aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 2 a
35	aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 2,5 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 3 a
	aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 3,5 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 4 a
	aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 4,5 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 5 a
	aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 7,5 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 10 a
	aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 15 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 20 a
40	aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 25 a
	aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 25 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 30 a
	aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 35 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 40 a
	aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 45 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 0,5 a
	aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 0,75 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 1 a
45	aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 2 a
	aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 2,5 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 3 a
	aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 3,5 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 4 a
	aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 4,5 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 5 a
	aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 7,5 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 10 a
50	aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 15 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 20 a
	aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 20 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 25 a
	aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 25 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 30 a
	aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 35 a aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 40 a
	aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 0,75 a
55	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 1,5 a
	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 2 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 2,5 a
	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 3 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 3,5 a
	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 4 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 4,5 a
	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 7,5 a
60	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 15 a
	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 20 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 20 a
	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 25 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 25 a
	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 30 a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 35 a
	aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 0,75 a

aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 1,5 a
aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 2 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 2,5 a
aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 3 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 3,5 a
aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 4 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 4,5 a
5 aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 7,5 a
aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 15 a
aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 20 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 20 a
aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 25 a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 0,5 a
aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 0,75 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 1 a
10 aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 2 a
aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 2,5 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 3 a
aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 3,5 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 4 a
aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 4,5 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 5 a
aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 7,5 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 10 a
15 aproximadamente 20 mg/kg, o aproximadamente 15 a aproximadamente 20 mg/kg. En una realización, el ARNbc se
administra a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg. Valores e intervalos
intermedios a los valores citados también pretenden ser parte de la presente invención.

Por ejemplo, los sujetos pueden administrarse con una cantidad terapéutica de ARNi, tal como aproximadamente
0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2,
20 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,
6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7,
8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5,
17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29,
29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o aproximadamente 50 mg/kg.
25 Valores e intervalos intermedios a los valores citados también pretenden ser parte de la presente divulgación.

En ciertas implementaciones, por ejemplo, cuando una composición comprende un ARNbc como se describe en el
presente documento y un lípido, los sujetos pueden administrarse con una cantidad terapéutica de ARNi, tal como
aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente
10 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg a
30 aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg
a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente
0,2 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg,
aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg a aproximadamente
5 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg a
35 aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a
aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg a
aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg a
aproximadamente aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg,
aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg,
40 aproximadamente 3,5 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg,
aproximadamente 4,5 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg,
aproximadamente 4,5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente
10 mg/kg, aproximadamente 5,5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg a
aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 6,5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg
45 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 7,5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente
8 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 8,5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg,
aproximadamente 9 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, o aproximadamente 9,5 mg/kg a aproximadamente
10 mg/kg. Valores e intervalos intermedios a los valores citados también pretenden ser parte de la presente
invención.

Por ejemplo, el ARNbc puede administrarse a una dosis de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8,
0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6,
3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4,
6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,1, 9,2,
9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, o aproximadamente 10 mg/kg. Valores e intervalos intermedios a los valores citados
55 también pretenden ser parte de la presente divulgación.

En ciertas implementaciones, por ejemplo, cuando un agente de iARN bicatenario incluye modificaciones (por
ejemplo, uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, incluyendo un motivo
tal en o cerca del sitio de escisión del agente), seis enlaces fosforotioato, y un ligando, un agente tal se administra a
una dosis de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente
60 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente
0,2 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente
0,09 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,08 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a
aproximadamente 0,07 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,06 mg/kg, aproximadamente

0,01 mg/kg a aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 0,09 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 0,08 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 0,07 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 0,06 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 0,09 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 0,08 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 0,07 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 0,06 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,04 mg/kg a aproximadamente 0,08 mg/kg, aproximadamente 0,04 mg/kg a aproximadamente 0,07 mg/kg, aproximadamente 0,04 mg/kg a aproximadamente 0,06 mg/kg, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 0,09 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 0,08 mg/kg, o aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 0,07 mg/kg. Valores e intervalos intermedios a los valores citados anteriores también pretenden ser parte de la presente divulgación, por ejemplo, el agente de iARN puede administrarse al sujeto a una dosis de aproximadamente 0,015 mg/kg a aproximadamente 0,45 mg/kg.

Por ejemplo, el agente de iARN, por ejemplo, el agente de iARN en una composición farmacéutica, puede administrarse a una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg, 0,0125 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,0175 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,0225 mg/kg, 0,025 mg/kg, 0,0275 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,0325 mg/kg, 0,035 mg/kg, 0,0375 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,0425 mg/kg, 0,045 mg/kg, 0,0475 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,0525 mg/kg, 0,055 mg/kg, 0,0575 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,0625 mg/kg, 0,065 mg/kg, 0,0675 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,0725 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,0775 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,0825 mg/kg, 0,085 mg/kg, 0,0875 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,0925 mg/kg, 0,095 mg/kg, 0,0975 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,125 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,175 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,225 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,275 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,325 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,375 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,425 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,475 mg/kg, o aproximadamente 0,5 mg/kg. Valores intermedios a los valores citados anteriores también pretenden ser parte de la presente divulgación.

La composición farmacéutica puede administrarse una vez al día, o el ARNi puede administrarse como dos, tres o más sub-dosis a intervalos apropiados a lo largo del día o incluso usando infusión continua o administración mediante una formulación de liberación controlada. En ese caso, el ARNi contenido en cada sub-dosis debe ser correspondientemente más pequeño con el fin de lograr la dosificación diaria total. La unidad de dosificación también puede calcularse para la administración durante varios días, por ejemplo, usando una formulación de liberación sostenida convencional que proporciona liberación sostenida del ARNi durante un periodo de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida son muy conocidas en la técnica y son particularmente útiles para la administración de agentes en un sitio particular, tal como podría usarse con los agentes de la presente invención. En esta realización, la unidad de dosificación contiene un múltiplo correspondiente de la dosis diaria.

En otras implementaciones, una dosis única de las composiciones farmacéuticas puede ser de larga duración, tal que las dosis posteriores se administren en intervalos de no más de 3, 4 o 5 días, o en intervalos de no más de 1, 2, 3 o 4 semanas. En algunas realizaciones de la invención, una dosis única de las composiciones farmacéuticas de la invención se administra una vez por semana. En otras implementaciones de la invención, una dosis única de las composiciones farmacéuticas de la invención se administra cada dos meses.

El experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y momento adecuado requerido para tratar eficazmente un sujeto, que incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos. Pueden hacerse cálculos estimados de dosificaciones eficaces y semividas *in vivo* para los ARNi individuales englobados por la invención usando metodologías convencionales o basándose en pruebas *in vivo* usando un modelo animal apropiado, como se describe en cualquier parte en el presente documento.

Los avances en la genética del ratón han generado varios modelos de ratón para el estudio de diversas enfermedades humanas, tales como un trastorno del hígado que se beneficiaría de la reducción en la expresión de *Serpina1*. Tales modelos pueden usarse para las pruebas *in vivo* del ARNi, además de para determinar una dosis terapéuticamente eficaz. Modelos de ratón adecuados se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, un ratón que contiene un transgén que expresa *Serpina1* humana.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de varias formas que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. La administración puede ser tópica (por ejemplo, por un parche transdérmico), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que

incluye por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intrarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; subdérmica, por ejemplo, mediante un dispositivo implantado; o intracraneal, por ejemplo, por administración intraparenquimatosa, intratecal o intraventricular.

- 5 El ARNi puede administrarse de un modo para elegir como diana un tejido particular, tal como el hígado (por ejemplo, los hepatocitos del hígado).

Composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, esprays, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles preservativos recubiertos, guantes y similares. Formulaciones tópicas adecuadas incluyen aquellas en las que los ARNi caracterizados en la invención están en mezcla con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Lípidos y liposomas adecuados incluyen neutros (por ejemplo, dioleoilfosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diesteoilfosfatidilcolina) negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleoiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoilfosfatidiletanolamina DOTMA). Los ARNi caracterizados en la invención pueden estar encapsulados dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los ARNi pueden complejarse con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Ácidos grasos y ésteres adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un éster de alquilo C₁₋₂₀ (por ejemplo, miristato de isopropilo IPM), monoglicérido, diglicérido o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos). Las formulaciones tópicas se describen en detalle en la patente de EE.UU. N.º 6.747.014.

A. Formulaciones de ARNi que comprenden ensamblajes moleculares membranosos

- 25 Un ARNi para su uso en las composiciones y métodos de la invención puede formularse para la administración en un ensamblaje molecular membranoso, por ejemplo, un liposoma o una micela. Como se usa en el presente documento, el término "liposoma" se refiere a una vesícula compuesta de lípidos anfifílicos dispuestos en al menos una bicapa, por ejemplo, una bicapa o una pluralidad de bicapas. Los liposomas incluyen vesículas unilaminares y multilaminares que tienen una membrana formada de un material lipófilo y un interior acuoso. La porción acuosa contiene la composición de ARNi. El material lipófilo aísla el interior acuoso de un exterior acuoso, que normalmente no incluye la composición de ARNi, aunque puede en algunos ejemplos. Los liposomas son útiles para la transferencia y administración de principios activos al sitio de acción. Debido a que la membrana liposómica es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando los liposomas se aplican a un tejido, la bicapa liposómica se fusiona con la bicapa de las membranas celulares. A medida que progresa la fusión del liposoma y la célula, el contenido acuoso interno que incluye el ARNi se administra a la célula en la que el ARNi puede unirse específicamente a un ARN diana y puede mediar en el iARN. En algunos casos, los liposomas también son específicamente elegidos como diana, por ejemplo, para dirigir el ARNi a tipos de células particulares.

- Un liposoma que contiene un agente de iARN puede prepararse mediante una variedad de métodos. En un ejemplo, el componente de lípido de un liposoma se disuelve en un detergente de manera que se formen micelas con el componente de lípido. Por ejemplo, el componente de lípido puede ser un lípido catiónico anfipático o conjugado de lípido. El detergente puede tener una alta concentración micelar crítica y puede ser no iónico. Detergentes a modo de ejemplo incluyen colato, CHAPS, octilglucósido, desoxicolato y lauroilsarcosina. Entonces, la preparación de agente de iARN se añade a las micelas que incluyen el componente de lípido. Los grupos catiónicos en el lípido interaccionan con el agente de iARN y condensan alrededor del agente de iARN para formar un liposoma. Después de la condensación, el detergente se elimina, por ejemplo, por diálisis, dando una preparación liposómica de agente de iARN.

- Si fuera necesario un compuesto de vehículo que ayudara en la condensación, puede añadirse durante la reacción de condensación, por ejemplo, por adición controlada. Por ejemplo, el compuesto de vehículo puede ser un polímero distinto de un ácido nucleico (por ejemplo, espermina o espermidina). El pH también puede ajustarse para favorecer la condensación.

- Métodos para producir vehículos de administración de polinucleótidos estables, que incorporan un complejo de polinucleótido/lípido catiónico como componentes estructurales del vehículo de administración, se describen adicionalmente en, por ejemplo, el documento WO 96/37194. La formación de liposomas también puede incluir uno o más aspectos de métodos a modo de ejemplo descritos en Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987; patente de EE.UU. N.º 4.897.355; patente de EE.UU. N.º 5.171.678; Bangham, et al. M. Mol. Biol. 23:238, 1965; Olson, et al. Biochim. Biophys. Acta 557:9, 1979; Szoka, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4194, 1978; Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984; Kim, et al. Biochim. Biophys. Acta 728:339, 1983; y Fukunaga, et al. Endocrinol. 115:757, 1984. Las técnicas comúnmente usadas para preparar agregados de lípidos de tamaño apropiado para su uso como vehículos de administración incluyen sonicación y congelación-descongelación más extrusión (véase, por ejemplo, Mayer, et al. Biochim. Biophys. Acta 858:161, 1986). Puede usarse microfluidización

cuando se deseen agregados coherentemente pequeños (50 a 200 nm) y relativamente uniformes (Mayhew, et al. Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984). Estos métodos se adaptan fácilmente para envasar preparaciones de agente de iARN en liposomas.

Los liposomas se clasifican en dos amplias clases. Los liposomas catiónicos son liposomas positivamente cargados que interaccionan con las moléculas negativamente cargadas de ácidos nucleicos para formar un complejo estable. El complejo de ácido nucleico/liposoma positivamente cargado se une a la superficie celular negativamente cargada y se internaliza en un endosoma. Debido al pH ácido dentro del endosoma, los liposomas se rompen, liberando su contenido al citoplasma celular (Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985).

Los liposomas que son sensibles al pH o están negativamente cargados atrapan ácidos nucleicos en vez de complejarse con ellos. Como tanto el ácido nucleico como el lípido están similarmente cargados, se produce repulsión en vez de formación de complejos. Sin embargo, algo del ácido nucleico queda atrapado dentro del interior acuoso de estos liposomas. Se han usado liposomas sensibles al pH para administrar ácidos nucleicos que codifican el gen timidina cinasa a monocapas de células en cultivo. La expresión del gen exógeno se detectó en las células diana (Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274).

Un tipo principal de composición liposómica incluye fosfolípidos distintos de fosfatidilcolina naturalmente derivada. Pueden formarse composiciones de liposomas neutras, por ejemplo, a partir de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Generalmente se forman composiciones de liposomas aniónicos a partir de dimiristoilfosfatidilglicerol, mientras que los liposomas fusogénicos aniónicos se forman principalmente a partir de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición liposómica se forma a partir de fosfatidilcolina (FC) tal como, por ejemplo, FC de soja y FC de huevo. Otro tipo se forma a partir de mezclas de fosfolípido y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.

Ejemplos de otros métodos para introducir liposomas en células *in vitro* e *in vivo* incluyen la patente de EE.UU. N.º 5.283.185; la patente de EE.UU. N.º 5.171.678; documentos WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Felgner, J. Biol. Chem. 269:2550, 1994; Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307, 1993; Nabel, Human Gene Ther. 3:649, 1992; Gershon, Biochem. 32:7143, 1993; y Strauss EMBO J. 11:417, 1992.

También se han examinado sistemas liposómicos no iónicos para determinar su utilidad en la administración de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden tensioactivo no iónico y colesterol. Se usaron formulaciones liposómicas no iónicas que comprenden Novasome™ I (dilaurato de glicerilo/colesterol/polioxietilen-10-estearil éter) y Novasome™ II (diestearato de glicerilo/colesterol/polioxietilen-10-estearil éter) para administrar ciclosporina A en la dermis de piel de ratón. Los resultados indicaron que tales sistemas liposómicos no iónicos fueron eficaces en facilitar la deposición de ciclosporina A en diferentes capas de la piel (Hu et al. S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4(6) 466).

Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", un término que, como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan en liposomas, producen vidas útiles en circulación potenciadas con respecto a liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los que parte de la porción del lípido formador de vesícula del liposoma (A) comprende uno o más glicolípidos, tales como monosialogangliósido G_{M1} , o (B) se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Aunque no se desea ceñirse a teoría particular alguna, se cree en la materia que, al menos para los liposomas estéricamente estabilizados que contienen gangliósidos, esfingomielina, o lípidos derivatizados con PEG, la potenciada semivida en circulación de estos liposomas estéricamente estabilizados se deriva de una captación reducida en células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Se conocen en la técnica diversos liposomas que comprenden uno o más glicolípidos. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) informaron de la capacidad del monosialogangliósido G_{M1} , sulfato de galactocerebrósido y fosfatidilinositol para mejorar las semividas en sangre de liposomas. Estos hallazgos se expusieron por Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). La patente de EE.UU. N.º 4.837.028 y el documento WO 88/04924, ambos por Allen et al., desvelan liposomas que comprenden (1) esfingomielina y (2) el gangliósido G_{M1} o un éster de sulfato de galactocerebrósido. La patente de EE.UU. N.º 5.543.152 (Webb et al.) desvela liposomas que comprenden esfingomielina. En el documento WO 97/13499 (Lim et al.) se desvelan liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina.

En una implementación, se usan liposomas catiónicos. Los liposomas catiónicos poseen la ventaja de poder fusionarse con la membrana celular. Se recogen liposomas no catiónicos, aunque no pueden fusionarse tan eficazmente con la membrana plasmática, por macrófagos *in vivo* y pueden usarse para administrar agentes de iARN a macrófagos.

Ventajas adicionales de los liposomas incluyen: los liposomas obtenidos de fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; los liposomas pueden incorporar un amplio intervalo de agua y fármacos solubles en lípidos; los liposomas pueden proteger agentes de iARN encapsulados en sus compartimentos internos del

metabolismo y la degradación (Rosoff, en "Pharmaceutical Dosage Forms", Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, volumen 1, p. 245). Consideraciones importantes en la preparación de formulaciones de liposomas son la carga de la superficie del lípido, tamaño de las vesículas y el volumen acuoso de los liposomas.

5 Puede usarse un lípido catiónico sintético positivamente cargado, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), para formar pequeños liposomas que interactúan espontáneamente con ácido nucleico para formar complejos de lípido-ácido nucleico que pueden fusionarse con los lípidos negativamente cargados de las membranas celulares de células de cultivo de tejido, produciendo la administración de agente de iARN (véase, por ejemplo, Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 y la patente de EE.UU. N.º 4.897.355 para una descripción de DOTMA y su uso con ADN).

10 Puede usarse un análogo de DOTMA, 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamoniaco)propano (DOTAP), en combinación con un fosfolípido para formar vesículas de complejación con ADN. Lipofectin™ de Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) es un agente eficaz para la administración de ácidos nucleicos altamente aniónicos en células de cultivo de tejido vivas que comprenden liposomas de DOTMA positivamente cargados que interactúan espontáneamente con polinucleótidos negativamente cargados para formar complejos. Si se usan suficientes
15 liposomas positivamente cargados, la carga neta en los complejos resultantes también es positiva. Los complejos positivamente cargados preparados de esta forma se unen espontáneamente a superficies celulares negativamente cargadas, se fusionan con la membrana plasmática y liberan eficazmente ácidos nucleicos funcionales a, por ejemplo, células de cultivo de tejido. Otro lípido catiónico comercialmente disponible, 1,2-bis(oleoiloxi)-3,3-(trimetilamoniaco)propano ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana), se diferencia de DOTMA en
20 que los restos de oleoiloxi están enlazados por enlaces éster, en vez de éter.

Otros compuestos de lípidos catiónicos informados incluyen aquellos que se han conjugado con una variedad de restos que incluyen, por ejemplo, carboxiespermina que se ha conjugado con uno de los dos tipos de lípidos e incluye compuestos tales como dioctaoileilamida de 5-carboxiespermilglicina ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin) y 5-carboxiespermil-amida de dipalmitoilfosfatidiletanolamina ("DPPES") (véase, por ejemplo, la
25 patente de EE.UU. N.º 5.171.678).

Otro conjugado de lípido catiónico incluye la derivatización del lípido con colesterol ("DC-Chol") que se ha formulado en liposomas en combinación con DOPE (véase, Gao, X. y Huang, L., Biochim. Biophys. Res. Commun. 179:280, 1991). Se ha informado que la lipopolisina, preparada conjugando polilisina con DOPE, es eficaz para la transfección en presencia de suero (Zhou, X. et al., Biochim. Biophys. Acta 1065:8, 1991). Para ciertas líneas
30 celulares, se dice que estos liposomas que contienen lípidos catiónicos conjugados presentan menor toxicidad y proporcionan transfección más eficaz que las composiciones que contienen DOTMA. Otros productos de lípido catiónico comercialmente disponibles incluyen DMRIE y DMRIE-HP (Vical, La Jolla, California) y Lipofectamine (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Otros lípidos catiónicos adecuados para la administración de oligonucleótidos se describen en los documentos WO 98/39359 y WO 96/37194.

35 Las formulaciones liposómicas son particularmente aptas para administración tópica, los liposomas presentan varias ventajas con respecto a otras formulaciones. Tales ventajas incluyen efectos secundarios reducidos relacionados con la alta absorción sistémica del fármaco administrado, elevada acumulación del fármaco administrado en la diana deseada y la capacidad de administrar agente de iARN en la piel. En algunas implementaciones, los liposomas se usan para administrar agente de iARN a células epidérmicas y también para potenciar la penetración de agente de
40 iARN en tejidos dérmicos, por ejemplo, en piel. Por ejemplo, los liposomas pueden aplicarse apicalmente. Se ha documentado la administración tópica de fármacos formulados como liposomas a la piel (véase, por ejemplo, Weiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, vol. 2, 405-410 y du Plessis et al., Antiviral Research, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. y Fould-Fogerite, S., Biotechniques 6:682-690, 1988; Itani, T. et al. Gene 56:267-276, 1987; Nicolau, C. et al. Meth. Enz. 149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. y Papahadjopoulos, D. Meth. Enz. 101:512-527, 1983;
45 Wang, C. Y. y Huang, L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7851-7855, 1987).

También se han examinado sistemas liposómicos no iónicos para determinar su utilidad en la administración de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden tensioactivo no iónico y colesterol. Se usaron formulaciones liposómicas no iónicas que comprenden Novasome I (dilaurato de glicerilo/colesterol/polioxietilen-10-estearil éter) y Novasome II (diestearato de glicerilo/colesterol/polioxietilen-10-estearil éter) para administrar un
50 fármaco a la dermis de piel de ratón. Tales formulaciones con agente de iARN son útiles para tratar un trastorno dermatológico.

Los liposomas que incluyen ARNi pueden hacerse altamente deformables. Tal deformabilidad puede permitir que los liposomas penetren a través de poros que son más pequeños que el radio promedio del liposoma. Por ejemplo, los transfersomas son un tipo de liposomas deformables. Los transfersomas pueden prepararse añadiendo activadores
55 del borde superficial, normalmente tensioactivos, a una composición liposómica convencional. Los transfersomas que incluyen agente de iARN pueden administrarse, por ejemplo, por vía subcutánea por infección con el fin de administrar agente de iARN a queratinocitos en la piel. Con el fin de cruzar intacta la piel de mamífero, las vesículas de lípidos deben pasar a través de una serie de poros finos, cada uno con un diámetro inferior a 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Además, debido a las propiedades del lípido, estos transfersomas

pueden ser auto-optimizantes (adaptables a la forma de los poros, por ejemplo, en la piel), auto-reparadores y frecuentemente pueden llegar a sus dianas sin fragmentarse, y frecuentemente se auto-cargan.

Otras formulaciones aceptadas para la presente invención se describen en las solicitudes provisionales de Estados Unidos N.º de serie 61/018.616, presentada el 2 de enero de 2008; 61/018.611, presentada el 2 de enero de 2008; 61/039.748, presentada el 26 de marzo de 2008; 61/047.087, presentada el 22 de abril de 2008 y 61/051.528, presentada el 8 de mayo de 2008. La solicitud PCT N.º PCT/US2007/080331, presentada el 3 de octubre de 2007, también describe formulaciones que son aceptadas para la presente invención.

Los transfersomas son todavía otro tipo de liposomas, y son agregados de lípidos altamente deformables que son candidatos atractivos para vehículos de administración de fármaco. Los transfersomas pueden describirse como gotitas de lípido que son tan altamente deformables que son fácilmente capaces de penetrar a través de los poros que son más pequeños que la gotita. Los transfersomas son adaptables al entorno en el que se usan, por ejemplo, son auto-optimizantes (adaptables a la forma de los poros, por ejemplo, en la piel), auto-reparadores, frecuentemente pueden llegar a sus dianas sin fragmentarse, y frecuentemente se auto-cargan. Para preparar transfersomas es posible añadir activadores del borde superficial, normalmente tensioactivos, a una composición liposómica convencional. Se han usado transfersomas para administrar albúmina de suero a la piel. Se ha mostrado que la administración mediada por transfersomas de albúmina de suero es tan eficaz como la inyección subcutánea de una disolución que contiene albúmina de suero.

Los tensioactivos encuentran una amplia aplicación en formulaciones tales como emulsiones (incluyendo microemulsiones) y liposomas. La forma más común de clasificar y ordenar las propiedades de los muchos tipos diferentes de tensioactivos, tanto naturales como sintéticos, es por el uso del equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB). La naturaleza del grupo hidrófilo (también conocido como la "cabeza") proporciona el medio más útil para clasificar los diferentes tensioactivos usados en formulaciones (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Si la molécula de tensioactivo no está ionizada, se clasifica como un tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos encuentran una amplia aplicación en productos farmacéuticos y cosméticos y pueden usarse durante un amplio intervalo de valores de pH. En general, sus valores de HLB oscilan de 2 a aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Los tensioactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitano, ésteres de sacarosa y ésteres etoxilados. También están incluidas en esta clase alcanolamidas no iónicas y éteres tales como etoxilatos de alcoholes grasos, alcoholes propoxilados y polímeros de bloques etoxilados/propoxilados. Los tensioactivos de polioxietileno son los miembros más populares de la clase de tensioactivos no iónicos.

Si la molécula de tensioactivo lleva una carga negativa cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como aniónico. Los tensioactivos aniónicos incluyen carboxilatos tales como jabones, lactilatos de acilo, acilamidas de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tales como sulfatos de alquilo y sulfatos de alquilo etoxilados, sulfonatos tales como alquilbencenosulfonatos, isetionatos de acilo, tauratos de acilo y sulfosuccinatos, y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de tensioactivos aniónicos son los sulfatos de alquilo y los jabones.

Si la molécula de tensioactivo lleva una carga positiva cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como catiónico. Tensioactivos catiónicos incluyen sales de amonio cuaternario y aminas etoxiladas. Las sales de amonio cuaternario son los miembros más usados de esta clase.

Si la molécula de tensioactivo tiene la capacidad de llevar tanto una carga positiva como negativa, el tensioactivo se clasifica como anfótero. Los tensioactivos anfóteros incluyen derivados de ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetaínas y fosfatidas.

Se ha revisado el uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

El ARNi para su uso en los métodos de la invención también puede proporcionarse como formulaciones micelares. Las "micelas" se definen en el presente documento como un tipo particular de ensamblaje molecular en el que moléculas anfipáticas están dispuestas en una estructura esférica tal que todas las porciones hidrófobas de las moléculas estén dirigidas hacia adentro, dejando las porciones hidrófilas en contacto con la fase acuosa circundante. Existe la disposición contraria si el entorno es hidrófobo.

Una formulación micelar mixta adecuada para la administración mediante membranas transdérmicas puede prepararse mezclando una disolución acuosa de la composición de ARNi, un sulfato de alquilo C₈ a C₂₂ de metal alcalino y un compuesto formador de micelas. Compuestos formadores de micelas a modo de ejemplo incluyen lecitina, ácido hialurónico, sales farmacéuticamente aceptables de ácido hialurónico, ácido glicólico, ácido láctico, extracto de camomila, extracto de pepino, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, monooleína, monooleatos, monolauratos, aceite de borraja, aceite de onagra, mentol, trihidroxioxocolanilglicina y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, glicerina, poliglicerina, lisina, polilisina, trioleína, éteres de polioxietileno y análogos de los mismos, polidocanol alquil éteres y análogos de los mismos, quenodesoxicolato, desoxicolato, y mezclas de los mismos. Los compuestos formadores de micelas pueden añadirse al mismo tiempo o después de la adición del

sulfato de alquilo de metal alcalino. Se formarán micelas mixtas con sustancialmente cualquier tipo de mezcla de los componentes, pero mezcla vigorosa, con el fin de proporcionar micelas de tamaño más pequeño.

En un método, se prepara una primera composición micelar que contiene la composición de ARNip y al menos el sulfato de alquilo de metal alcalino. A continuación, la primera composición micelar se mezcla con al menos tres compuestos formadores de micelas para formar una composición micelar mixta. En otro método, la composición micelar se prepara mezclando la composición de ARNip, el sulfato de alquilo de metal alcalino y al menos uno de los compuestos formadores de micelas, seguido de la adición de los restantes compuestos formadores de micelas, con mezcla vigorosa.

Puede añadirse fenol y/o m-cresol a la composición micelar mixta para estabilizar la formulación y proteger contra el crecimiento bacteriano. Alternativamente, puede añadirse fenol y/o m-cresol con los componentes formadores de micelas. También puede añadirse un agente isotónico tal como glicerina después de la formación de la composición micelar mixta.

Para la administración de la formulación micelar como espray, la formulación puede ponerse en un dispensador de aerosol y el dispensador se carga con un propulsor. El propulsor, que está bajo presión, está en forma líquida en el dispensador. Las relaciones de los componentes se ajustan de manera que las fases acuosas y de propulsor sean una, es decir, hay una fase. Si hay dos fases, es necesario agitar el dispensador antes de dispensar una porción del contenido, por ejemplo, mediante una válvula de dosificación. La dosis dispensada de agente farmacéutico es expulsada de la válvula de dosificación en un fino espray.

Los propulsores pueden incluir clorofluorocarburos que contienen hidrógeno, fluorocarburos que contienen hidrógeno, éter dimetílico y éter dietílico. En ciertas realizaciones puede usarse HFA 134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano).

Las concentraciones específicas de los componentes esenciales pueden determinarse por experimentación relativamente directa. Para absorción mediante las cavidades bucales, es frecuentemente deseable aumentar, por ejemplo, al menos el doble o triple, la dosificación para mediante inyección o administración mediante el tubo gastrointestinal.

B. Partículas de lípido

Los ARNi, por ejemplo, ARNbc de la invención pueden estar completamente encapsulados en una formulación de lípido, por ejemplo, una LNP, u otra partícula de ácido nucleico-lípido.

Como se usa en el presente documento, el término "LNP" se refiere a una partícula de ácido nucleico-lípido estable. Las LNP contienen un lípido catiónico, un lípido no catiónico y un lípido que previene la agregación de la partícula (por ejemplo, un conjugado de PEG-lípido). Las LNP son extremadamente útiles para aplicaciones sistémicas, ya que presentan vidas útiles en circulación prolongadas tras la inyección intravenosa (i.v.) y se acumulan en sitios distales (por ejemplo, sitios físicamente separados del sitio de administración). Las LNP incluyen "pSPLP", que incluyen un complejo de agente de condensación-ácido nucleico encapsulado como se expone en la publicación PCT N.º WO 00/03683. Las partículas de la presente invención normalmente tienen un diámetro medio de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, más normalmente aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, más normalmente aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, lo más normalmente aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm, y son sustancialmente no tóxicas. Además, los ácidos nucleicos, cuando están presentes en las partículas de ácido nucleico-lípido de la presente invención, son resistentes en disolución acuosa a la degradación con una nucleasa. Las partículas de ácido nucleico-lípido y su método de preparación se desvelan en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.976.567; 5.981.501; 6.534.484; 6.586.410; 6.815.432; publicación de EE.UU. N.º 2010/0324120 y publicación PCT N.º WO 96/40964.

En una implementación, la relación de lípido con respecto a fármaco (relación masa/masa) (por ejemplo, relación de lípido con respecto a ARNbc) estará en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 50:1, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 25:1, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 9:1, o aproximadamente 6:1 a aproximadamente 9:1. También se contempla que intervalos intermedios a los intervalos anteriormente citados son parte de la invención.

El lípido catiónico puede ser, por ejemplo, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), N,N-dimetil-2,3-dioleiloiloxi)propilamina (DODMA), 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-dilinoileilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoileioxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-dilinoileioxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-dilinoileoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoileilto-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-linoileoil-2-linoileiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMA), sal de cloruro de 1,2-dilinoileiloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de cloruro de 1,2-dilinoileoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-dilinoileiloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ), o 3-(N,N-dilinoileilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1,2-propanodio (DOAP), 1,2-dilinoileiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-dilinoileil-4-

dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA) o análogos de los mismos, (3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahydro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100), 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanodiil)didodecan-2-ol (Tech G1), o una

mezcla de los mismos. El lípido catiónico puede comprender de aproximadamente el 20 % en moles a aproximadamente el 50 % en moles o aproximadamente el 40 % en moles del lípido total presente en la partícula.

En otra implementación, el compuesto 2,2-dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano puede usarse para preparar nanopartículas de lípido-ARNip. La síntesis de 2,2-dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano se describe en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos número 61/107,998 presentada el 23 de octubre de 2008.

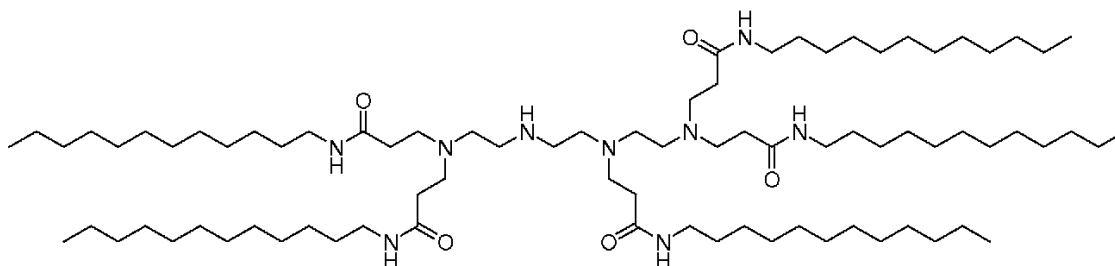
En una realización, la partícula de lípido-ARNip incluye 40 % de 2,2-dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano: 10 % de DSPC: 40 % de colesterol: 10 % de PEG-C-DOMG (porcentaje en moles) con un tamaño de partícula de $63,0 \pm 20$ nm y una de relación de ARNip/lípido de 0,027.

El lípido ionizable/no catiónico puede ser un lípido aniónico o un lípido neutro que incluye, pero no se limita a, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-l-carboxilato de dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidil-etanolamina (DSPE), 16-O-monometil-PE, 16-O-dimetil-PE, 18-1-trans-PE, 1-estearoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), colesterol, o una mezcla de los mismos. El lípido no catiónico puede ser de aproximadamente el 5 % en moles a aproximadamente el 90 % en moles, aproximadamente 10 % en moles, o aproximadamente el 58 % en moles si se incluye colesterol, del contenido de lípido total en la partícula.

El lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas puede ser, por ejemplo, un polietilenglicol (PEG)-lípido que incluye, sin limitación, un PEG-diacilglicerol (DAG), un PEG-dialquiloipropilo (DAA), un PEG-fosfolípido, una PEG-ceramida (Cer), o una mezcla de los mismos. El conjugado PEG-DAA puede ser, por ejemplo, un PEG-dilauriloipropilo (C_{12}), un PEG-dimiristiloipropilo (C_{14}), un PEG-dipalmitiloipropilo (C_{16}) o un PEG-diesteariloipropilo (C_{18}). El lípido conjugado que previene la agregación de partículas puede ser del 0 % en moles a aproximadamente el 20 % en moles o aproximadamente el 2 % en moles del lípido total presente en la partícula.

En algunas realizaciones, la partícula de ácido nucleico-lípido incluye colesterol a, por ejemplo, aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 60 % en moles o aproximadamente el 48 % en moles del lípido total presente en la partícula.

En una realización, el lipidoide ND98-4HCl (MW 1487) (véase la solicitud de patente de EE.UU. N.º 12/056.230, presentada el 26/03/2008), colesterol (Sigma-Aldrich) y PEG-ceramida C16 (Avanti Polar Lipids) pueden usarse para preparar nanopartículas de lípido-ARNbc (es decir, partículas de LNP01). Pueden prepararse disoluciones madre de cada uno en etanol del siguiente modo: ND98, 133 mg/ml; colesterol, 25 mg/ml, PEG-ceramida C16, 100 mg/ml. Las disoluciones madre de ND98, colesterol y PEG-ceramida C16 pueden entonces combinarse en una relación molar, por ejemplo, 42:48:10. La disolución de lípido combinada puede mezclarse con ARNbc acuoso (por ejemplo, en acetato sódico a pH 5) de forma que la concentración de etanol final sea de aproximadamente el 35-45 % y la concentración de acetato sódico final sea aproximadamente 100-300 mM. Las nanopartículas de lípido-ARNbc normalmente se forman espontáneamente tras la mezcla. Dependiendo de la distribución deseada del tamaño de partícula, la mezcla de nanopartículas resultante puede extraerse a través de una membrana de policarbonato (por ejemplo, corte de 100 nm) usando, por ejemplo, una prensa extrusora de cilindro térmico, tal como la prensa extrusora Lipex (Northern Lipids, Inc). En algunos casos, puede omitirse la etapa de extrusión. La eliminación de etanol y el intercambio de tampón simultáneo pueden llevarse a cabo, por ejemplo, por diálisis o filtración de flujo tangencial. El tampón puede intercambiarse con, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS) a aproximadamente pH 7, por ejemplo, aproximadamente pH 6,9, aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 7,1, aproximadamente pH 7,2, aproximadamente pH 7,3, o aproximadamente pH 7,4.



Isómero I de ND98

Fórmula 1

Las formulaciones de LNP01 se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud internacional N.º WO 2008/042973.

Formulaciones de lípido-ARNbc a modo de ejemplo adicionales se describen en la Tabla A.

Tabla A.

	Lípido ionizable/catiónico	Conjugado de lípido catiónico/lípido no catiónico/colesterol/PEG-lípido Relación de lípido:ARNip
LNP-1	1,2-Dilinoileno-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/colesterol/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) Lípido:ARNip ~ 7:1
2-XTC	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DPPC/colesterol/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 Lípido:ARNip ~ 7:1
LNP05	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/colesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 Lípido:ARNip ~ 6:1
LNP06	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/colesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 Lípido:ARNip ~ 11:1
LNP07	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, Lípido:ARNip ~ 6:1
LNP08	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, Lípido:ARNip ~ 11:1
LNP09	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNip 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahydro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100)	ALN100/DSPC/colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNip 10:1
LNP11	4-(Dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo (MC3)	MC-3/DSPC/colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNip 10:1

LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanodii)didodecan-2-ol (Tech G1)	Tech G1/DSPC/colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNip: 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNip: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 Lípido:ARNip: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 Lípido:ARNip: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNip: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNip: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNip: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 Lípido:ARNip: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNip: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNip: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNip: 10:1
DSPC: diestearoilfosfatidilcolina DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina PEG-DMG: PEG-didimristoilglicerol (C14-PEG, o PEG-C14) (PEG con peso en moles promedio de		

2000)

PEG-DSG: PEG-diestirilglicerol (C18-PEG, o PEG-C18) (PEG con peso en moles promedio de 2000)

PEG-cDMA: PEG-carbamoil-1,2-dimiristiloxipropilamina (PEG con peso en moles promedio de 2000)

LNP (1,2-dilineniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)) que comprende formulaciones descritas en la publicación internacional N.º WO2009/127060, presentada el 15 de abril de 2009.

XTC que comprende formulaciones descritas, por ejemplo, en la solicitud provisional de EE.UU. N.º de serie 61/148.366, presentada el 29 de enero de 2009; la solicitud provisional de EE.UU. N.º de serie 61/156.851, presentada el 2 de marzo de 2009; la solicitud provisional de EE.UU. N.º de serie presentada el 10 de junio 2009; la solicitud provisional de EE.UU. N.º de serie 61/228.373, presentada el 24 de julio de 2009; la solicitud provisional de EE.UU. N.º de serie 61/239.686, presentada el 3 de septiembre de 2009, y la solicitud internacional N.º PCT/US2010/022614, presentada el 29 de enero 2010.

MC3 que comprende formulaciones descritas, por ejemplo, en la publicación de EE.UU. N.º 2010/0324120, presentada el 10 de junio de 2010.

ALNY-100 que comprende formulaciones descritas, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional número PCT/US09/63933, presentada el 10 de noviembre de 2009.

C12-200 que comprende formulaciones descritas en la solicitud provisional de EE.UU. N.º de serie 61/175.770, presentada el 5 de mayo de 2009 y la solicitud internacional N.º PCT/US10/33777, presentada el 5 de mayo de 2010.

Síntesis de lípidos ionizables/catiónicos

Cualquiera de los compuestos, por ejemplo, lípidos catiónicos y similares, usados en las partículas de ácido nucleico-lípido de la invención puede prepararse por técnicas de síntesis orgánica conocidas, que incluyen los métodos descritos en más detalle en los ejemplos. Todos los sustituyentes son como se definen más adelante, a menos que se indique lo contrario.

"Alquilo" significa un hidrocarburo alifático saturado de cadena lineal o ramificado, no cíclico o cíclico, que contiene de 1 a 24 átomos de carbono. Alquilos de cadena lineal saturados representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo y similares; mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, isopentilo y similares. Alquilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares; mientras que alquilos cíclicos insaturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo y similares.

"Alquenilo" significa un alquilo, como se ha definido anteriormente, que contiene al menos un doble enlace entre átomos de carbono adyacentes. Alquenilos incluyen tanto isómeros cis como trans. Alquenilos de cadena lineal y ramificados representativos incluyen etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo y similares.

"Alquinilo" significa cualquier alquilo o alquenilo, como se ha definido anteriormente, que contiene adicionalmente al menos un triple enlace entre carbonos adyacentes. Alquinilos de cadena lineal y ramificados representativos incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1 butinilo y similares.

"Acilo" significa cualquier alquilo, alquenilo o alquinilo en el que el carbono en el punto de unión está sustituido con un grupo oxo, como se define más adelante. Por ejemplo, -C(=O)alquilo, -C(=O)alquenilo y -C(=O)alquinilo son grupos acilo.

"Heterociclo" significa un anillo heterocíclico monocíclico de 5 a 7 miembros, o bicíclico de 7 a 10 miembros, que está tanto saturado, insaturado, como es aromático, y que contiene 1 o 2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre, y en el que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, que incluye anillos bicíclicos en los que cualquiera de los heterociclos anteriores están condensados con un anillo de benceno. El heterociclo puede unirse mediante cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos incluyen heteroarilos como se definen más adelante. Los heterociclos incluyen morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperizinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidroprimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo y similares.

Los términos "alquilo opcionalmente sustituido", "alquenilo opcionalmente sustituido", "alquinilo opcionalmente sustituido", "acilo opcionalmente sustituido" y "heterociclo opcionalmente sustituido" significan que, cuando están

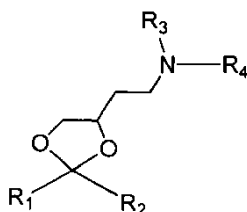
sustituídos, al menos un átomo de hidrógeno está sustituido con un sustituyente. En el caso de un sustituyente oxo (=O) se sustituyen dos átomos de hidrógeno. A este respecto, los sustituyentes incluyen oxo, halógeno, heterociclo, -CN, -OR_x, -NR_xR_y, -NR_xC(=O)R_y, -NR_xSO₂R_y, -C(=O)R_x, -C(=O)OR_x, -C(=O)NR_xR_y, -SOnR_x y -SOnNR_xR_y, en los que n es 0, 1 o 2, R_x y R_y son iguales o diferentes e independientemente hidrógeno, alquilo o heterociclo, y cada uno de dichos sustituyentes alquilo y heterociclo puede estar adicionalmente sustituido con uno o más de oxo, halógeno, -OH, -CN, alquilo, -OR_x, heterociclo, -NR_xR_y, -NR_xC(=O)R_y, -NR_xSO₂R_y, -C(=O)R_x, -C(=O)OR_x, -C(=O)NR_xR_y, -SOnR_x y -SOnNR_xR_y.

"Halógeno" significa flúor, cloro, bromo y yodo.

En algunas implementaciones, los métodos de la invención pueden requerir el uso de grupos protectores. La metodología de grupos protectores es muy conocida para aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, Protective Groups in Organic Synthesis, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). Brevemente, grupos protectores dentro del contexto de la presente invención son cualquier grupo que reduzca o elimine la reactividad no deseada de un grupo funcional. Un grupo protector puede añadirse a un grupo funcional para enmascarar su reactividad durante ciertas reacciones y luego se elimina para revelar el grupo funcional original. En algunas implementaciones se usa un "grupo protector de alcohol". Un "grupo protector de alcohol" es cualquier grupo que disminuya o elimine la reactividad no deseada de un grupo funcional de alcohol. Los grupos protectores pueden añadirse y eliminarse usando técnicas muy conocidas en la técnica.

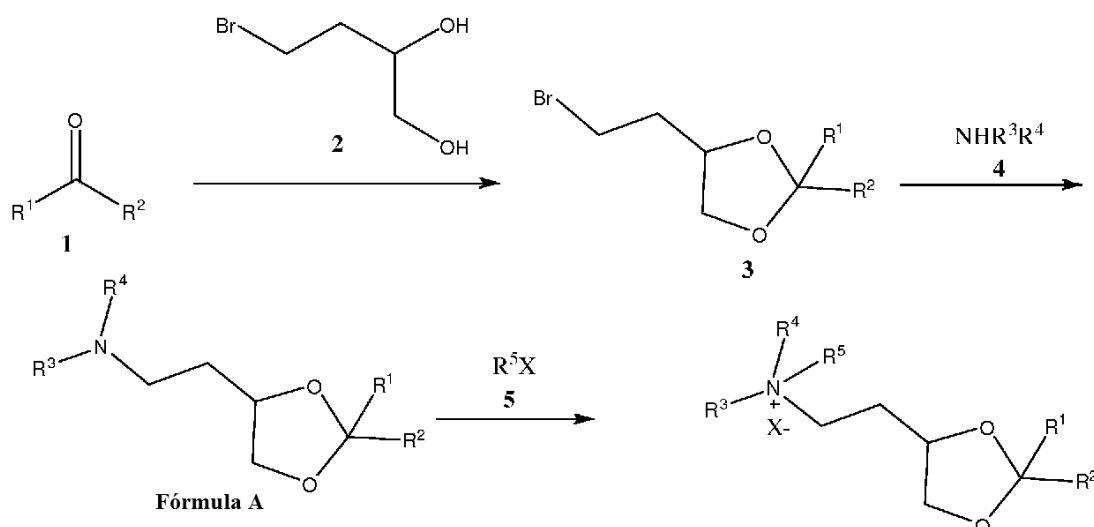
Síntesis de la fórmula A

En algunas implementaciones, las partículas de ácido nucleico-lípido de la invención se formulan usando un lípido catiónico de fórmula A:



en la que R₁ y R₂ son independientemente alquilo, alquenoilo o alquiniilo, cada uno puede estar opcionalmente sustituido, y R₃ y R₄ son independientemente alquilo inferior o R₃ y R₄ pueden tomarse conjuntamente para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el lípido catiónico es XTC (2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano). En general, el lípido de fórmula A anterior puede prepararse por los siguientes Esquemas de reacción 1 o 2, en los que todos los sustituyentes son como se han definido anteriormente, a menos que se indique lo contrario.

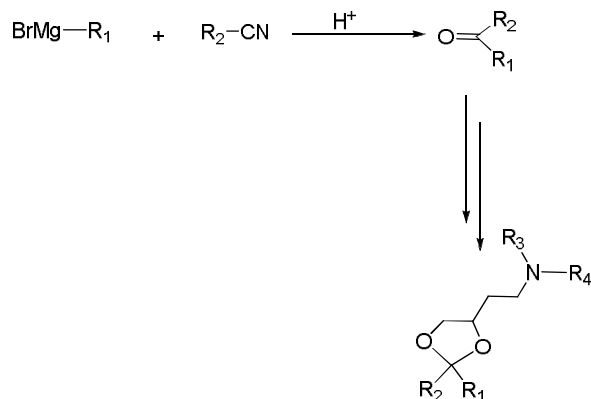
Esquema 1



El lípido A, en el que R₁ y R₂ son independientemente alquilo, alquenoilo o alquiniilo, cada uno puede estar opcionalmente sustituido, y R₃ y R₄ son independientemente alquilo inferior o R₃ y R₄ pueden tomarse conjuntamente para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido, puede prepararse según el Esquema 1. La cetona 1 y el bromuro 2 pueden comprarse o prepararse según métodos conocidos para aquellos expertos

habituales en la materia. La reacción de 1 y 2 da el cetal 3. El tratamiento del cetal 3 con la amina 4 da los lípidos de fórmula A. Los lípidos de fórmula A pueden convertirse en la sal de amonio correspondiente con una sal orgánica de fórmula 5, en la que X es el contraión aniónico seleccionado de halógeno, hidróxido, fosfato, sulfato o similares.

Esquema 2



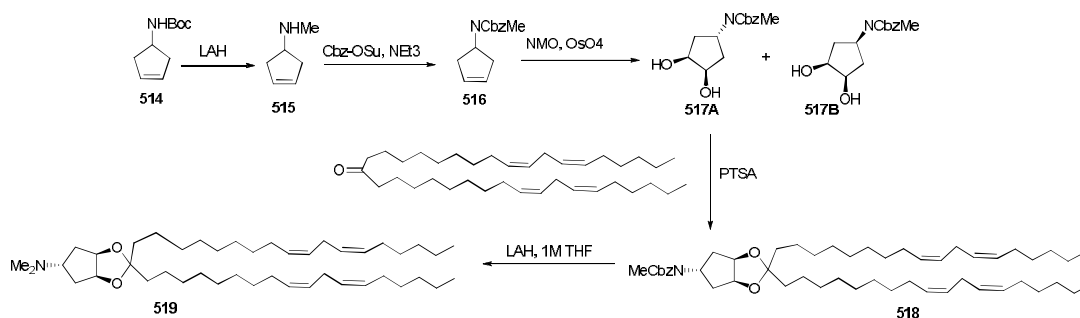
Alternativamente, el material de partida de cetona 1 puede prepararse según el Esquema 2. El reactivo de Grignard 6 y el cianuro 7 pueden comprarse o prepararse según métodos conocidos para aquellos expertos habituales en la materia. La reacción de 6 y 7 da la cetona 1. La conversión de la cetona 1 en los lípidos correspondientes de fórmula A es como se ha descrito en el Esquema 1.

Síntesis de MC3

La preparación de DLin-M-C3-DMA (es decir, 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo) fue del siguiente modo. Se agitó una disolución de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ol (0,53 g), clorhidrato del ácido 4-N,N-dimetilaminobutírico (0,51 g), 4-N,N-dimetilaminopiridina (0,61 g) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,53 g) en diclorometano (5 ml) a temperatura ambiente durante la noche. La disolución se lavó con ácido clorhídrico diluido, seguido de bicarbonato sódico acuoso diluido. Las fracciones orgánicas se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y el disolvente se eliminó en un rotavapor. El residuo se pasó a través de una columna de gel de sílice (20 g) usando un gradiente de elución del 1-5 % de metanol/diclorometano. Se combinaron las fracciones que contenían el producto purificado y el disolvente se eliminó, dando un aceite incoloro (0,54 g).

Síntesis de ALNY-100

La síntesis del cetal 519 [ALNY-100] se realizó usando el siguiente Esquema 3:



Síntesis de 515

A una suspensión con agitación de LiAlH₄ (3,74 g, 0,09852 moles) en 200 ml de THF anhidro en un RBF de dos bocas (1 l) se añadió una disolución de 514 (10 g, 0,04926 moles) en 70 ml de THF lentamente a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno. Después de completarse la adición, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y a continuación se calentó a reflujo durante 4 h. El progreso de la reacción se monitorizó por CCF. Después de completarse la de reacción (por CCF), la mezcla se enfrió a 0 °C y se extinguió con la adición cuidadosa de disolución saturada de Na₂SO₄. La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente y se separó por filtración. El residuo se lavó bien con THF. El filtrado y los lavados se mezclaron y se diluyeron con 400 ml de dioxano y 26 ml de HCl conc. y se agitaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los volátiles se separaron por arrastre a vacío dando la sal de clorhidrato de 515 como un sólido blanco. Rendimiento: 7,12 g RMN ¹H (DMSO, 400 MHz): δ= 9,34 (ancho, 2H), 5,68 (s, 2H), 3,74 (m, 1H), 2,66-2,60 (m, 2H), 2,50-2,45 (m, 5H).

Síntesis de 516

A una disolución con agitación del compuesto 515 en 100 ml de DCM seco en un RBF de dos bocas de 250 ml se añadió NEt₃ (37,2 ml, 0,2669 moles) y se enfrió a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno. Después de una lenta adición de N-(benciloxi-carboniloxi)-succinimida (20 g, 0,08007 moles) en 50 ml de DCM seco, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción (2-3 h por CCF), la mezcla se lavó sucesivamente con disolución 1 N de HCl (1 x 100 ml) y disolución saturada de NaHCO₃ (1 x 50 ml). A continuación, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó dando el material en bruto que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para conseguir 516 como una masa pegajosa. Rendimiento: 11 g (89 %). RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7,36-7,27 (m, 5H), 5,69 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,96 (a., 1H) 2,74 (s, 3H), 2,60 (m, 2H), 2,30-2,25 (m, 2H). LC-MS [M+H]⁺ -232,3 (96,94 %).

Síntesis de 517A y 517B

El ciclopenteno 516 (5 g, 0,02164 moles) se disolvió en una disolución de 220 ml de acetona y agua (10:1) en un RBF de una sola boca de 500 ml y a él se añadió N-óxido de N-metilmorfolina (7,6 g, 0,06492 moles), seguido de 4,2 ml de disolución al 7,6 % de OsO₄ (0,275 g, 0,00108 moles) en terc-butanol a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción (~ 3 h), la mezcla se inactivó con la adición de Na₂SO₃ sólido y la mezcla resultante se agitó durante 1,5 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (300 ml) y se lavó con agua (2 x 100 ml), seguido de disolución saturada de NaHCO₃ (1 x 50 ml), agua (1 x 30 ml) y finalmente con salmuera (1 x 50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se eliminó a vacío. La purificación cromatográfica en columna de gel de sílice del material en bruto dio una mezcla de diaestereómeros, que se separaron por HPLC prep. Rendimiento: - 6 g brutos

517A - Pico-1 (sólido blanco), 5,13 g (96 %). RMN ¹H (DMSO, 400 MHz): δ= 7,39-7,31 (m, 5H), 5,04 (s, 2H), 4,78-4,73 (m, 1H), 4,48-4,47 (d, 2H), 3,94-3,93 (m, 2H), 2,71 (s, 3H), 1,72- 1,67 (m, 4H). LC-MS - [M+H]⁺-266,3, [M+NH₄]⁺-283,5 presente, HPLC-97,86 %. Estereoquímica confirmada por rayos X.

Síntesis de 518

Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del compuesto 505, el compuesto 518 (1,2 g, 41 %) se obtuvo como un aceite incoloro. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ= 7,35-7,33 (m, 4H), 7,30-7,27 (m, 1H), 5,37-5,27 (m, 8H), 5,12 (s, 2H), 4,75 (m, 1H), 4,58-4,57 (m, 2H), 2,78-2,74 (m, 7H), 2,06-2,00 (m, 8H), 1,96-1,91 (m, 2H), 1,62 (m, 4H), 1,48 (m, 2H), 1,37-1,25 (a m, 36H), 0,87 (m, 6H). HPLC-98,65 %.

Procedimiento general para la síntesis del compuesto 519

Se añadió una disolución del compuesto 518 (1 eq) en hexano (15 ml) en un modo gota a gota a una disolución fría en hielo de LAH en THF (1 M, 2 eq). Después de completarse adición, la mezcla se calentó a 40 °C durante 0,5 h, a continuación se enfrió de nuevo en un baño de hielo. La mezcla se hidrolizó cuidadosamente con Na₂SO₄ acuoso saturado, luego se filtró a través de Celite y se redujo a un aceite. La cromatografía en columna proporcionó 519 puro (1,3 g, 68 %), que se obtuvo como un aceite incoloro. RMN ¹³C δ = 130,2, 130,1 (x2), 127,9 (x3), 112,3, 79,3, 64,4, 44,7, 38,3, 35,4, 31,5, 29,9 (x2), 29,7, 29,6 (x2), 29,5 (x3), 29,3 (x2), 27,2 (x3), 25,6, 24,5, 23,3, 22,6, 14,1; EM por electropulverización (+va): Peso molecular para C₄₄H₈₀NO₂ (M + H)⁺ Calc. 654,6, Hallado 654,6.

Las formulaciones preparadas por tanto el método convencional como libre de extrusión pueden caracterizarse de maneras similares. Por ejemplo, las formulaciones normalmente se caracterizan por inspección visual. Deben ser disoluciones translúcidas blanquecinas libres de agregados o sedimento. El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula de las nanopartículas de lípido pueden medirse por dispersión de la luz usando, por ejemplo, un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, EE.UU.). Las partículas deben tener aproximadamente 20-300 nm, tal como 40-100 nm de tamaño. La distribución del tamaño de partícula debe ser unimodal. La concentración de ARNbc total en la formulación, además de la fracción atrapada, se estima usando un ensayo de exclusión de colorante. Una muestra de ARNbc formulado puede incubarse con un colorante de unión a ARN, tal como Ribogreen (Molecular Probes) en presencia o ausencia de un tensioactivo de rotura de la formulación, por ejemplo, 0,5 % de Triton-X100. El ARNbc total en la formulación puede determinarse por la señal de la muestra que contiene el tensioactivo, con respecto a una curva patrón. La fracción atrapada se determina restando el contenido de ARNbc "libre" (como se mide por la señal en ausencia de tensioactivo) del contenido de ARNbc total. El porcentaje de ARNbc atrapado es normalmente >85 %. Para la formulación de LNP, el tamaño de partícula es al menos 30 nm, al menos 40 nm, al menos 50 nm, al menos 60 nm, al menos 70 nm, al menos 80 nm, al menos 90 nm, al menos 100 nm, al menos 110 nm y al menos 120 nm. El intervalo adecuado normalmente es aproximadamente al menos 50 nm a aproximadamente al menos 110 nm, aproximadamente al menos 60 nm a aproximadamente al menos 100 nm, o aproximadamente al menos 80 nm a aproximadamente al menos 90 nm.

Las composiciones y formulaciones para administración por vía oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o disoluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicompimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. En algunas realizaciones, las formulaciones orales son aquellas en las que los ARNbc caracterizados en la invención se administran conjuntamente con uno o más tensioactivos potenciadores

- de la penetración y quelantes. Tensioactivos adecuados incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Ácidos biliares/sales adecuados incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA) y ácido ursodesoxicóquenosoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido dehidrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio y glicodihidrofusidato de sodio. Ácidos grasos adecuados incluyen ácido araquidónico, ácido undecanoico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un monoglicérido, un diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos (por ejemplo, sodio). En algunas realizaciones, se usan combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación a modo de ejemplo es la sal de sodio del ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Potenciadores de la penetración adicionales incluyen polioxietilen-9-lauril éter, polioxietilen-20-cetil éter. Los ARNbc caracterizados en la invención pueden administrarse por vía oral, en forma granulada que incluye partículas secadas por pulverización, o complejados para formar micro o nanopartículas. Los agentes de complejación de ARNbc incluyen poli-aminoácidos; poliiminas; poliácridatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albúminas, almidones, acrilatos, polietilenglicoles (PEG) y almidones; polialquilcianoacrilatos; poliiminas derivatizadas con DEAE, polulanos, celulosas y almidones. Agentes complejantes adecuados incluyen quitosano, N-trimetilquitosano, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiodietilaminometiltileno P(TDAE), poliaminostireno (por ejemplo, p-amino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butílicoacrilato), poli(isobutílicoacrilato), poli(isohexílicoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-albúmina y DEAE-dextrano, polimetilacrilato, polihexilacrilato, poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido DL-láctico-co-glicólico (PLGA), alginato, y polietilenglicol (PEG). Formulaciones orales para ARNbc y su preparación se describen en detalle en la patente de EE.UU. 6,887,906, la publicación de EE.UU. N.º 20030027780 y la patente de EE.UU. N.º 6.747.014, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia.
- Composiciones y formulaciones para administración parenteral, intraparenquimatosa (en el cerebro), intratecal, intraventricular o intrahepática pueden incluir disoluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero no se limitan a, potenciadores de la penetración, compuestos de vehículo y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- Las composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos previamente formados, sólidos auto-emulsionantes y semisólidos auto-emulsionantes. Particularmente se prefieren formulaciones que se dirigen al hígado cuando se tratan trastornos hepáticos tales como carcinoma hepático.
- Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales muy conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el (los) vehículo(s) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente en asociación los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y entonces, si fuera necesario, moldeando el producto.
- Las composiciones pueden formularse en cualquiera de las muchas posibles formas de dosificación tales como, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

C. Formulaciones adicionales

Emulsiones

- Las composiciones de la presente invención pueden prepararse y formularse como emulsiones. Las emulsiones normalmente son sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que normalmente superan 0,1 µm de diámetro (véase, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), New York, NY; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volumen 1, p. 245; Block en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 2, p. 335; Higuchi et al., en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Las emulsiones son frecuentemente sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles íntimamente mezcladas y dispersadas entre sí. En general, las emulsiones pueden ser de tanto la variedad de agua en aceite (w/o) como de aceite en agua (o/w). Cuando una fase acuosa se divide finamente en y se dispersa como gotitas ínfimas en una fase aceitosa a granel, la composición resultante se llama una emulsión de agua en aceite (w/o). Alternativamente, cuando una fase aceitosa

está finamente dividida en y dispersada como gotitas ínfimas en una fase acuosa a granel, la composición resultante se llama una emulsión de aceite en agua (o/w). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales, además de las fases dispersadas, y el fármaco activo que puede estar presente como una disolución en tanto la fase acuosa, fase aceitosa como en sí misma como una fase separada. Excipientes farmacéuticos tales como emulsionantes, estabilizadores, colorantes y antioxidantes también pueden estar presentes en emulsiones según se necesite. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que comprenden más de dos fases tales como, por ejemplo, en el caso de emulsiones de aceite en agua en aceite (o/w/o) y agua en aceite en agua (w/o/w). Tales formulaciones complejas frecuentemente proporcionan ciertas ventajas que no tienen las emulsiones binarias simples. Múltiples emulsiones en las que gotitas de aceite individuales de una emulsión o/w encierran pequeñas gotitas de agua constituyen una emulsión w/o/w. Asimismo, un sistema de gotitas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizados en una fase continua aceitosa proporciona una emulsión o/w/o.

Las emulsiones se caracterizan por poca o ninguna estabilidad termodinámica. Frecuentemente, la fase dispersada o discontinua de la emulsión está bien dispersada en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma mediante emulsionantes o la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser un semisólido o un sólido, como es el caso de bases de pomada y cremas del estilo emulsión. Otros medios de estabilizar emulsiones conllevan el uso de emulsionantes que pueden incorporarse en cualquier fase de la emulsión. Los emulsionantes pueden clasificarse ampliamente en cuatro categorías: tensioactivos sintéticos, emulsionantes que se producen naturalmente, bases de absorción y sólidos finamente dispersados (véase, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Los tensioactivos sintéticos, también conocidos como agentes tensioactivos, han encontrado una amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones y se han revisado en la bibliografía (véase, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 285; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volumen 1, p. 199). Los tensioactivos normalmente son anfífilos y comprenden una porción hidrófila y una hidrófoba. La relación de la naturaleza hidrófila con respecto a la hidrófoba del tensioactivo se ha llamado el equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una valiosa herramienta en clasificar y seleccionar tensioactivos en la preparación de formulaciones. Los tensioactivos pueden clasificarse en diferentes clases basándose en la naturaleza del grupo hidrófilo: no iónico, aniónico, catiónico y anfótero (véase, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 285).

Los emulsionantes que se producen naturalmente usados en las formulaciones en emulsión incluyen lanolina, cera de abeja, fosfatidas, lecitina y goma arábiga. Las bases de absorción poseen propiedades hidrófilas de forma que puedan absorber agua para formar emulsiones w/o que todavía retienen sus consistencias semisólidos, tales como lanolina anhidra y vaselina hidrófila. También se han usado sólidos finamente divididos como buenos emulsionantes, especialmente en combinación con tensioactivos y en preparaciones viscosas. Éstos incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas no hinchables tales como bentonita, atapulgita, hectorita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de magnesio y aluminio coloidal, pigmentos y sólidos no polares tales como carbono o triestearato de glicerilo.

También están incluidos en las formulaciones en emulsión una gran variedad de materiales no emulsionantes y contribuyen a las propiedades de las emulsiones. Éstos incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrófilos, conservantes y antioxidantes (Block, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 335; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Los coloides hidrófilos o hidrocoloides incluyen gomas que se producen naturalmente y polímeros sintéticos tales como polisacáridos (por ejemplo, goma arábiga, agar, ácido alginico, carragenina, goma guar, goma karaya y tragacanto), derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa) y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa y polímeros de carboxivinilo). Éstos se dispersan o hinchan en agua para formar disoluciones coloidales que estabilizan las emulsiones formando fuertes películas interfaciales alrededor de las gotitas de fase dispersada y aumentando la viscosidad de la fase externa.

Como las emulsiones contienen frecuentemente varios componentes tales como hidratos de carbono, proteínas, esteroides y fosfatidas que pueden soportar fácilmente el crecimiento de microbios, estas formulaciones frecuentemente incorporan conservantes. Conservantes comúnmente usados incluidos en las formulaciones en emulsión incluyen metilparabeno, propilparabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico y ácido bórico. También se añaden comúnmente antioxidantes a las formulaciones en emulsión para prevenir el deterioro de la formulación. Los antioxidantes usados pueden ser secuestrantes de radicales libres tales como tocoferoles, galatos de alquilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado o agentes

reductores tales como ácido ascórbico y metabisulfito de sodio, y sinergistas de antioxidantes tales como ácido cítrico, ácido tartárico y lecitina.

Se ha revisado la aplicación de formulaciones en emulsión mediante las vías dermatológica, oral y parenteral y los métodos para su fabricación en la bibliografía (véanse, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199). Las formulaciones en emulsión para administración oral se han usado muy ampliamente debido a la facilidad de formulación, además de la eficacia desde un punto de vista de la absorción y biodisponibilidad (véanse, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199). Los laxantes de base de aceite mineral, vitaminas liposolubles y preparaciones nutritivas ricas en grasas están entre los materiales que se han administrado comúnmente por vía oral como emulsiones o/w.

ii. Microemulsiones

En una implementación de la presente invención, las composiciones de los ARNi y ácidos nucleicos se formulan como microemulsiones. Una microemulsión puede definirse como un sistema de agua, aceite y anfífilo que es una disolución líquida ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable única (véase, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245). Normalmente, las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando primero un aceite en una disolución de tensioactivo acuoso y a continuación añadiendo una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por tanto, también se han descrito microemulsiones como dispersiones isotrópicamente claras termodinámicamente estables, de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan por películas interfaciales de moléculas tensioactivas (Leung y Shah, en: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, páginas 185-215). Las microemulsiones se preparan comúnmente mediante una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, tensioactivo, co-tensioactivo y electrolito. Si la microemulsión es del tipo agua en aceite (w/o) o aceite en agua (o/w) depende de las propiedades del aceite y tensioactivo usados y de la estructura y el empaquetamiento geométrico de las cabezas polares y colas de hidrocarburo de las moléculas de tensioactivo (Schott, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

El enfoque fenomenológico que utiliza diagramas de fases se ha estudiado ampliamente y ha dado un amplio conocimiento, para un experto en la materia, de cómo formular microemulsiones (véase, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245; Block, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 335). En comparación con emulsiones convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar fármacos insolubles en agua en una formulación de gotitas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente.

Los tensioactivos usados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos, Brij 96, polioxietilén oleil éteres, ésteres de ácidos grasos de poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sesquioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), solos o en combinación con co-tensioactivos. El co-tensioactivo, normalmente un alcohol de cadena corta, tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para aumentar la fluidez interfacial penetrando en la película del tensioactivo y, por consiguiente, creando una película desordenada debido al espacio vacío generado entre moléculas de tensioactivo. Sin embargo, las microemulsiones pueden prepararse sin el uso de co-tensioactivos y se conocen en la técnica sistemas de microemulsiones auto-emulsionantes libres de alcohol. La fase acuosa puede normalmente ser, pero no se limita a, agua, una disolución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poliglicérols, propilenglicoles y derivados de etilenglicol. La fase aceitosa puede incluir, pero no se limita a, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono, di, y tri-glicéridos de cadena media (C8-C12), ésteres de ácidos grasos de glicerilo polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C8-C10 poliglicolizados saturados, aceites vegetales y aceite de silicona.

Las microemulsiones son particularmente de interés desde el punto de vista de la solubilización del fármaco y la potenciada absorción de fármacos. Se han propuesto microemulsiones basadas en lípidos (tanto o/w como w/o) para potenciar la biodisponibilidad oral de fármacos, que incluyen péptidos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 6.191.105; 7.063.860; 7.070.802; 7.157.099; Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Las microemulsiones proporcionan ventajas de

solubilización del fármaco mejorada, protección del fármaco de la hidrólisis enzimática, posible potenciamiento de la absorción del fármaco debido a alteraciones inducidas por el tensioactivo en la fluidez y permeabilidad de la membrana, facilidad de preparación, facilidad de administración por vía oral con respecto a formas de dosificación sólidas, potencia clínica mejorada y toxicidad reducida (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 6.191.105; 7.063.860; 7.070.802; 7.157.099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Frecuentemente, las microemulsiones pueden formarse espontáneamente cuando sus componentes se ponen juntos a temperatura ambiente. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando se formulan fármacos termolábiles, péptidos o ARNi. Las microemulsiones también han sido eficaces en la administración transdérmica de componentes activos en tanto aplicaciones cosméticas como farmacéuticas. Se espera que las composiciones en microemulsión y las formulaciones de la presente invención faciliten la elevada absorción sistémica de los ARNi y ácidos nucleicos del tubo gastrointestinal, además de mejorar la captación celular local de los ARNi y ácidos nucleicos.

Las microemulsiones de la presente invención también pueden contener componentes y aditivos adicionales tales como monoestearato de sorbitano (Grill 3), Labrasol y potenciadores de la penetración para mejorar las propiedades de la formulación y para potenciar la absorción de los ARNi y ácidos nucleicos de la presente invención. Los potenciadores de la penetración usados en las microemulsiones de la presente invención pueden clasificarse como que pertenecen a una de las cinco amplias categorías—tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Cada uno de estas clases se ha tratado anteriormente.

iii. Micropartículas

Un agente de iARN de la invención puede incorporarse en una partícula, por ejemplo, una micropartícula. Las micropartículas pueden producirse por secado por pulverización, pero también pueden producirse por otros métodos que incluyen liofilización, evaporación, secado en lecho fluidizado, secado a vacío, o una combinación de estas técnicas.

iv. Potenciadores de la penetración

En una implementación, se emplean diversos potenciadores de la penetración para efectuar la eficaz administración de ácidos nucleicos, particularmente ARNi, a la piel de animales. La mayoría de los fármacos están presentes en disolución en tanto formas ionizadas como no ionizadas. Sin embargo, normalmente solo los fármacos liposolubles o lipófilos cruzan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso los fármacos no lipófilos pueden cruzar membranas celulares si la membrana que va a cruzarse se trata con un potenciador de la penetración. Además de ayudar en la difusión de fármacos no lipófilos a través de las membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos.

Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de las cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes (véase, por ejemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Cada uno de las clases anteriormente mencionadas de potenciadores de la penetración se describe a continuación en mayor detalle.

Los tensioactivos (o "agentes tensioactivos") son entidades químicas que, cuando se disuelven en una disolución acuosa, reducen la tensión superficial de la disolución o la tensión interfacial entre la disolución acuosa y otro líquido, con el resultado de que se potencia la absorción de los ARNi mediante la mucosa. Además de sales biliares y ácidos grasos, estos potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, laurilsulfato de sodio, polioxietilen-9-lauril éter y polioxietilen-20-cetil éter (véase, por ejemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92); y emulsiones perfluoroquímicas, tales como FC-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Diversos ácidos grasos y sus derivados que actúan de potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerol, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, ésteres de alquilo C₁₋₂₀ de los mismos (por ejemplo, metilo, isopropilo y t-butilo) y mono- y di-glicéridos de los mismos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (véase, por ejemplo, Touitou, E., et al. *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

La función fisiológica de la bilis incluye facilitar la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas liposolubles (véase, por ejemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Capítulo 38 en: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Diversas sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, actúan de potenciadores de la penetración. Así el término "sales biliares" incluye cualquiera de los componentes que

se producen naturalmente de la bilis, además de cualquiera de sus derivados sintéticos. Sales biliares adecuadas incluyen, por ejemplo, ácido cólico (o su sal farmacéuticamente aceptable de sodio, colato de sodio), ácido dehidrocólico (dehidrocolato de sodio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sodio), ácido glucólico (glucolato de sodio), ácido glicólico (glicocolato de sodio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sodio), ácido taurocólico (taurocolato de sodio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sodio), ácido quenodesoxicólico (quenodesoxicolato de sodio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio (STDHF), glicodihidrofusidato de sodio y polioxietilen-9-lauril éter (POE) (véanse, por ejemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Capítulo 39 en: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, páginas 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

Los agentes quelantes, como se usa a propósito de la presente invención, pueden definirse como compuestos que eliminan iones metálicos de la disolución formando complejos con los mismos, con el resultado de que se potencia la absorción de los ARNi a través de la mucosa. Con respecto a su uso como potenciadores de la penetración en la presente invención, los agentes quelantes tienen la ventaja añadida de que también sirven de inhibidores de DNasa, ya que las ADN nucleasas más caracterizadas requieren un ión metálico divalente para la catálisis y así son inhibidos por agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Agentes quelantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, etilendiaminetetraacetato de disodio (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovanilato), derivados de N-acilo de colágeno, lauril éter-9 y derivados de N-aminoacilo de beta-dicetonas (enaminas) (véanse, por ejemplo, Katdare, A. et al., *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Como se usa en el presente documento, los compuestos potenciadores de la penetración no tensioactivos no quelantes pueden definirse como compuestos que demuestran actividad insignificativa como agentes quelantes o como tensioactivos, pero que sin embargo potencian la absorción de los ARNi a través de la mucosa alimentaria (véase, por ejemplo, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Esta clase de potenciadores de la penetración incluye, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de 1-alkil- y 1-alquenilazacilo-alcanonas (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); y agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como diclofenaco sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

También pueden añadirse agentes que potencian la captación de los ARNi al nivel celular a las composiciones farmacéuticas y otras composiciones de la presente invención. Por ejemplo, también se conocen lípidos catiónicos, tales como Lipofectin (Junichi et al., patente de EE.UU. N.º 5.705.188), derivados de glicerol catiónicos y moléculas policationicas, tales como polilisina (Lollo et al., solicitud PCT WO 97/30731), para potenciar la captación celular de ARNbc. Ejemplos de reactivos de transfección comercialmente disponibles incluyen, por ejemplo, Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), 293fectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Cellfectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), DMRIE-C™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Oligofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Optifect™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), reactivo de transfección X-tremeGENE Q2 (Roche; Grenzacherstrasse, Suiza), reactivo de transfección liposómica DOTAP (Grenzacherstrasse, Suiza), reactivo de transfección liposómica DOSPER (Grenzacherstrasse, Suiza) o Eugene (Grenzacherstrasse, Suiza), reactivo Transfectam® (Promega; Madison, WI), reactivo de transfección TransFast™ (Promega; Madison, WI), reactivo Tfx™-20 (Promega; Madison, WI), reactivo Tfx™-50 (Promega; Madison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marsella, Francia), EcoTransfect (OZ Biosciences; Marsella, Francia), reactivo de transfección TransPass® D1 (New England Biolabs; Ipswich, MA, EE.UU.), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; San Diego, CA, USA), reactivo de transfección PerFectin (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección NeuroPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección GenePORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección GenePORTER 2 (Genlantis; San Diego, CA, USA), reactivo de transfección Cytofectin (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección BaculoPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección TroganPORTER™ (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), RiboFect (Bioline; Taunton, MA, EE.UU.), PlasFect (Bioline; Taunton, MA, EE.UU.), UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EE.UU.), SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EE.UU.) o HiFect™ (B-Bridge International; Mountain View, CA, EE.UU.), entre otros.

Pueden utilizarse otros agentes para potenciar la penetración de los ácidos nucleicos administrados, que incluyen glicoles tales como etilenglicol y propilenglicol, pirroles tales como 2-pirrol, azonas y terpenos tales como limoneno y mentona.

v. Vehículos

Ciertas composiciones de la presente invención también incorporan compuestos de vehículo en la formulación. Como se usa en el presente documento, "compuesto de vehículo" o "vehículo" puede referirse a un ácido nucleico, o

análogo del mismo, que es inerte (es decir, no posee actividad biológica por sí mismo), pero es reconocido como un ácido nucleico por procesos *in vivo* que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tiene actividad biológica, por ejemplo, degradando el ácido nucleico biológicamente activo o promoviendo su eliminación de la circulación. La coadministración de un ácido nucleico y un compuesto de vehículo, normalmente con un exceso de la última sustancia, puede producir una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperada en el hígado, riñón u otros depósitos extracirculatorios, supuestamente debido a la competición entre el compuesto de vehículo y el ácido nucleico para un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un ARNbc parcialmente de fosforotioato en tejido hepático puede reducirse cuando se co-administra con ácido poliinosínico, sulfato de dextrano, ácido policitídico o diácido 4-acetamido-4'-isotiociano-estilbeno-2,2'-sulfónico (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

vi. Excipientes

A diferencia de un compuesto de vehículo, un "vehículo farmacéutico" o "excipiente" es un disolvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para administrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, teniendo en cuenta el modo planeado de administración, de manera que se proporcione el volumen deseado, consistencia, etc., cuando se combine con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Vehículos farmacéuticos típicos incluyen, pero no se limitan a, agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); cargas (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato sódico, etc.); disgregantes (por ejemplo, almidón, glicolato sódico de almidón, etc.); y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.).

También pueden usarse excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración no parenteral que no reaccionan perjudicialmente con los ácidos nucleicos para formular las composiciones de la presente invención. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, disoluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Las formulaciones para administración tópica de ácidos nucleicos pueden incluir disoluciones acuosas estériles y no estériles, disoluciones no acuosas en disolventes comunes tales como alcoholes, o disoluciones de los ácidos nucleicos en bases de aceite líquidas o sólidas. Las disoluciones también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Pueden usarse excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración no parenteral que no reaccionan perjudicialmente con ácidos nucleicos.

Excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, disoluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

vii. Otros componentes

Las composiciones de la presente invención pueden contener adicionalmente otros componentes auxiliares convencionalmente encontrados en composiciones farmacéuticas, a sus niveles de uso establecidos en la materia. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos compatibles adicionales tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, espesantes y estabilizadores. Sin embargo, tales materiales, cuando se añaden, no deben interferir excesivamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no interaccionan perjudicialmente con el (los) ácido(s) nucleico(s) de la formulación.

Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

En algunas implementaciones, las composiciones farmacéuticas incluyen (a) uno o más compuestos de ARNi y (b) uno o más agentes que funcionan por un mecanismo no de iARN y que son útiles en el tratamiento de un trastorno hemorrágico. Ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, un agente antiinflamatorio, agente antiesteatosis, agente antiviral y/o antifibrosis. Además, también pueden usarse otras sustancias comúnmente usadas para proteger el hígado, tales como silimarina, conjuntamente con los ARNi descritos en el presente documento. Otros agentes útiles para tratar enfermedades del hígado incluyen telbivudina, entecavir e inhibidores de

la proteasa tales como telaprevir y otros desvelados, por ejemplo, en Tung et al., publicaciones de solicitud de EE.UU. N.º 2005/0148548, 2004/0167116 y 2003/0144217; y en Hale et al., publicación de solicitud de EE.UU. N.º 2004/0127488.

La toxicidad y eficacia terapéutica de tales compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL50/DE50. Se prefieren compuestos que presentan altos índices terapéuticos.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de composiciones caracterizadas en el presente documento en la invención se encuentra generalmente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en los métodos caracterizados en la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante del compuesto o, cuando convenga, del producto de polipéptido de una secuencia diana (por ejemplo, logrando una concentración disminuida del polipéptido) que incluye la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición al 50 % de los síntomas) como se ha determinado en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Además de su administración, como se trata anteriormente, los ARNi caracterizados en la invención pueden administrarse en combinación con otros agentes conocidos eficaces en el tratamiento de procesos patológicos mediados por la expresión de Serpina1. En cualquier caso, el médico que administra puede ajustar la cantidad y el momento exacto de la administración de ARNi basándose en resultados observados usando medidas estándar de eficacia conocidas en la técnica o descritas en el presente documento.

IV. Métodos para inhibir la expresión Serpina1

La presente divulgación proporciona métodos para inhibir la expresión de una Serpina1 en una célula. Los métodos incluyen poner en contacto una célula con un agente de iARN, por ejemplo, un agente de iARN bicatenario, en una cantidad eficaz para inhibir la expresión de la Serpina1 en la célula, inhibiendo así la expresión de la Serpina1 en la célula.

La puesta en contacto de una célula con un agente de iARN bicatenario puede hacerse *in vitro* o *in vivo*. La puesta en contacto de una célula *in vivo* con el agente de iARN incluye poner en contacto una célula o grupo de células dentro de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, con el agente de iARN. También son posibles combinaciones de métodos *in vitro* e *in vivo* de poner en contacto. La puesta en contacto puede ser directa o indirecta, como se trata anteriormente. Además, la puesta en contacto de una célula puede llevarse a cabo mediante un ligando que elige diana, que incluye cualquier ligando descrito en el presente documento o conocido en la técnica. En implementaciones preferidas, el ligando que elige diana es un resto de hidrato de carbono, por ejemplo, un ligando de GalNAc3, o cualquier otro ligando que dirige el agente de iARN a un sitio de interés, por ejemplo, el hígado de un sujeto.

El término "inhibir", como se usa en el presente documento, se usa indistintamente con "reducir", "silenciar", "regular por disminución" y otros términos similares, e incluye cualquier nivel de inhibición.

La expresión "inhibir la expresión de un Serpina1", pretende referirse a la inhibición de la expresión de cualquier gen Serpina1 (tal como, por ejemplo, un gen Serpina1 de ratón, un gen Serpina1 de rata, un gen Serpina1 de mono o un gen Serpina1 humano) además de variantes o mutantes de un gen Serpina1. Así, el gen Serpina1 puede ser un gen Serpina1 no mutante, un gen Serpina1 mutante o un gen Serpina1 transgénico en el contexto de una célula genéticamente manipulada, grupo de células u organismo.

"Inhibir la expresión de un gen Serpina1" incluye cualquier nivel de inhibición de un gen Serpina1, por ejemplo, supresión al menos parcial de la expresión de un gen Serpina1. La expresión del gen Serpina1 puede evaluarse basándose en el nivel, o el cambio en el nivel, de cualquier variable asociada a la expresión del gen Serpina1, por ejemplo, nivel de ARNm de Serpina1, nivel de proteína Serpina1, o niveles de lípidos. Este nivel puede evaluarse en una célula individual o en un grupo de células, que incluyen, por ejemplo, una muestra derivada de un sujeto.

La inhibición puede evaluarse por una disminución en un nivel absoluto o relativo de una o más de estas variables que están asociadas a la expresión de Serpina1 en comparación con un nivel de control. El nivel de control puede ser cualquier tipo de nivel de control que se utiliza en la materia, por ejemplo, un nivel inicial pre-dosis, o un nivel determinado a partir de un sujeto, célula o muestra similar que no está tratado o está tratado con un control (tal como, por ejemplo, control solo de tampón o control de agente inactivo).

En algunas implementaciones de los métodos de la invención, la expresión de un gen *Serpina1* se inhibe al menos aproximadamente el 5 %, al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %.

La inhibición de la expresión de un gen *Serpina1* puede manifestarse por una reducción de la cantidad de ARNm expresado por una primera célula o grupo de células (tales células pueden estar presentes, por ejemplo, en una muestra derivada de un sujeto) en las que un gen *Serpina1* se transcribe y que ha sido tratada o han sido tratadas (por ejemplo, poniendo en contacto la célula o células con un agente de iARN de la invención, o administrando un agente de iARN de la invención a un sujeto en el que las células están o estaban presentes) de forma que se inhiba la expresión de un gen *Serpina1*, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idéntica a la primera célula o grupo de células, pero que no se ha tratado o no se han tratado así (célula(s) de control). En realizaciones preferidas, la inhibición se evalúa expresando el nivel de ARNm en células tratadas como un porcentaje del nivel de ARNm en células de control, usando la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{ARNm en células de control}) - (\text{ARNm en células tratadas})}{(\text{ARNm en células de control})} \cdot 100 \%$$

Alternativamente, la inhibición de la expresión de un gen *Serpina1* puede evaluarse en términos de una reducción de un parámetro que está funcionalmente ligado a la expresión del gen *Serpina1*, por ejemplo, la expresión de proteínas *Serpina1*, tales como ALT, fosfatasa alcalina, bilirrubina, protrombina y albúmina. El silenciamiento del gen *Serpina1* puede determinarse en cualquier célula que exprese *Serpina1*, tanto constitutivamente como por ingeniería genómica, y por cualquier ensayo conocidos en la técnica. El hígado es el principal sitio de expresión de *Serpina1*. Otros sitios de expresión significativos incluyen el páncreas, el riñón y los intestinos.

La inhibición de la expresión de una proteína *Serpina1* puede manifestarse por una reducción en el nivel de la proteína *Serpina1* que se expresa por una célula o grupo de células (por ejemplo, el nivel de proteína expresada en una muestra derivada de un sujeto). Como se ha explicado anteriormente para la evaluación de la supresión de ARNm, la inhibición de los niveles de expresión de proteína en una célula tratada o grupo de células puede expresarse similarmente como un porcentaje del nivel de proteína en una célula de control o grupo de células.

Una célula de control o grupo de células que puede usarse para evaluar la inhibición de la expresión de un gen *Serpina1* incluye una célula o grupo de células que todavía no se ha puesto en contacto con un agente de iARN de la invención. Por ejemplo, la célula de control o grupo de células puede derivarse de un sujeto individual (por ejemplo, un sujeto humano o animal) antes del tratamiento del sujeto con un agente de iARN.

El nivel de ARNm de *Serpina1* que se expresa por una célula o grupo de células puede determinarse usando cualquier método conocido en la técnica para evaluar la expresión de ARNm. En una realización, el nivel de expresión de *Serpina1* en una muestra se determina detectando un polinucleótido transcrito, o porción del mismo, por ejemplo, ARNm del gen *Serpina1*. El ARN puede extraerse de células usando técnicas de extracción de ARN que incluyen, por ejemplo, usando extracción con fenol ácido/isotiocianato de guanidina (RNAzol B; Biogenesis), kits de preparación de ARN RNeasy (Qiagen) o PAXgene (PreAnalytix, Suiza). Formatos de ensayo típicos que utilizan hibridación de ácidos ribonucleicos incluyen ensayos de transcripción nuclear, RT-PCR, ensayos de protección con RNasa (Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035), transferencia Northern, hibridación in situ y análisis de micromatrices.

En una implementación, el nivel de expresión de *Serpina1* se determina usando una sonda de ácido nucleico. El término "sonda", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula que puede unirse selectivamente a un *Serpina1* específico. Las sondas pueden sintetizarse por un experto en la materia, o derivarse de preparaciones biológicas apropiadas. Las sondas pueden diseñarse específicamente para ser marcadas. Ejemplos de moléculas que pueden utilizarse como sondas incluyen, pero no se limitan a, ARN, ADN, proteínas, anticuerpos y moléculas orgánicas.

Puede usarse ARNm aislado en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y matrices de sondas. Un método para la determinación de niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridarse con ARNm de *Serpina1*. En una realización, el ARNm se inmoviliza sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo, migrando el ARNm aislado sobre un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En una realización alternativa, la(s) sonda(s) se inmoviliza(n) sobre una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con la(s) sonda(s), por ejemplo,

en un matriz de chip génico Affymetrix. Un experto puede adaptar fácilmente métodos de detección de ARNm conocidos para su uso en determinar el nivel de ARNm de Serpina1.

Un método alternativo para determinar el nivel de expresión de Serpina1 en una muestra implica el proceso de amplificación de ácido nucleico y/o transcriptasa inversa (para preparar ADNc) de, por ejemplo, ARNm en la muestra, por ejemplo, por RT-PCR (la realización experimental expuesta en Mullis, 1987, patente de EE.UU. N.º 4.683.202), reacción en cadena de la ligasa (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193), replicación auto-sostenida de secuencias (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Q-beta replicasa (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197), replicación por círculo rodante (Lizardi et al., patente de EE.UU. N.º 5.854.033) o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácidos nucleicos si tales moléculas están presentes en números muy bajos. En aspectos particulares de la invención, el nivel de expresión de Serpina1 se determina por RT-PCR fluorogénica cuantitativa (es decir, el sistema TaqManTM).

Los niveles de expresión de ARNm de Serpina1 pueden monitorizarse usando una transferencia en membrana (tal como se usa en análisis de hibridación tales como Northern, Southern, puntual y similares), o micropocillos, tubos de muestra, geles, perlas o fibras (o cualquier soporte sólido que comprenda ácidos nucleicos unidos). Véanse las patentes de EE.UU. N.º 5.770.722, 5.874.219, 5.744.305, 5.677.195 y 5.445.934. La determinación del nivel de expresión de Serpina1 también puede comprender usar sondas de ácido nucleico en disolución.

En implementaciones preferidas, el nivel de expresión de ARNm se evalúa usando ensayos de ADN ramificado (ADNr) o PCR en tiempo real (qPCR). El uso de estos métodos se describe y ejemplifica en los ejemplos presentados en el presente documento.

El nivel de la expresión de proteínas Serpina1 puede determinarse usando cualquier método conocido en la técnica para la medición de niveles de proteína. Tales métodos incluyen, por ejemplo, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de hiperdifusión, reacciones con precipitina fluida o en gel, espectroscopía de absorción, ensayos colorimétricos, ensayos espectrofotométricos, citometría de flujo, inmunodifusión (individual o doble), inmunoelectroforesis, transferencia Western, radioinmunoensayo (RIA), enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), ensayos inmunofluorescentes, ensayos de electroquimioluminiscencia y similares.

El término "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a una colección de fluidos, células o tejidos similares aislados de un sujeto, además de fluidos, células o tejidos presentes dentro de un sujeto. Ejemplos de fluidos biológicos incluyen sangre, suero y fluidos serosos, plasma, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, fluidos oculares y similares. Las muestras de tejido pueden incluir muestras de tejidos, órganos o regiones localizadas. Por ejemplo, las muestras pueden derivarse de órganos, partes de órganos, o fluidos o células particulares dentro de aquellos órganos. En ciertas realizaciones, las muestras pueden derivarse del hígado (por ejemplo, hígado completo o ciertos segmentos del hígado o ciertos tipos de células en el hígado tales como, por ejemplo, hepatocitos). En realizaciones preferidas, una "muestra derivada de un sujeto" se refiere a sangre o plasma extraído del sujeto. En otras implementaciones, una "muestra derivada de un sujeto" se refiere a tejido de hígado derivado del sujeto.

En algunas implementaciones de los métodos de la invención, el agente de iARN se administra a un sujeto tal que el agente de iARN se administre a un sitio específico dentro del sujeto. La inhibición de la expresión de Serpina1 puede evaluarse usando mediciones del nivel o cambio en el nivel de ARNm de Serpina1 o proteína Serpina1 en una muestra derivada de fluido o tejido del sitio específico dentro del sujeto. En implementaciones preferidas, el sitio es el hígado. El sitio también puede ser una subsección o subgrupo de células de uno cualquiera de los sitios anteriormente mencionados. El sitio también puede incluir células que expresan un tipo particular de receptor.

V. Métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada a Serpina1

La presente divulgación también proporciona métodos de prevención o tratamiento de enfermedades y afecciones que pueden modularse regulando por disminución la expresión del gen Serpina1. Por ejemplo, las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para tratar enfermedades asociadas a Serpina1, tales como enfermedades del hígado, por ejemplo, enfermedad hepática crónica, inflamación del hígado, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular, y otras afecciones patológicas que pueden asociarse a estos trastornos, tales como la inflamación pulmonar, enfisema y EPOC.

También se describen métodos de inhibición del desarrollo de carcinoma hepatocelular en un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene una variante de deficiencia de Serpina1. Los métodos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención al sujeto, inhibiéndose así el desarrollo de carcinoma hepatocelular en el sujeto.

También se describen métodos y usos de las composiciones de la invención para reducir la acumulación de Serpina1 erróneamente plegada en el hígado de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene una variante de deficiencia de Serpina1. Los métodos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición

de la invención al sujeto, reduciéndose así la acumulación de Serpina1 erróneamente plegada en el hígado del sujeto.

Como se usa en el presente documento, un "sujeto" incluye un animal humano o animal no humano, preferentemente un vertebrado, y más preferentemente un mamífero. Un sujeto puede incluir un organismo transgénico. Lo más preferentemente, el sujeto es un ser humano, tal como un ser humano que padece o tiene predisposición a desarrollar una enfermedad asociada a Serpina1. En una realización, el sujeto padece o tiene predisposición a desarrollar una enfermedad asociada a Serpina1 tiene uno o más alelos deficientes en Serpina1, por ejemplo, un alelo PIZ, PIS o PIM(Malton).

Un agente de ARNi de la invención puede administrarse en combinación con un agente terapéutico adicional. El agente de ARNi y un agente terapéutico adicional pueden administrarse en combinación en la misma composición, por ejemplo, por vía parenteral, o el agente terapéutico adicional puede administrarse como parte de una composición separada o por otro método descrito en el presente documento.

Ejemplos de agentes terapéuticos adicionales adecuados para su uso en los métodos incluyen aquellos agentes conocidos para tratar trastornos del hígado, tales como cirrosis hepática. Por ejemplo, un agente de ARNi caracterizado en la invención puede administrarse con, por ejemplo, ácido ursodesoxicólico (UDCA), agentes inmunosupresores, metotrexato, corticosteroides, ciclosporina, colchicina, tratamientos antipruríticos, tales como antihistamínicos, colestiramina, colestipol, rifampina, dronabinol (Marinol) y plasmaféresis, antibióticos profilácticos, luz ultravioleta, suplementos de cinc, y vacunación contra hepatitis A, gripe y neumococos.

La expresión de Serpina1 del método puede ser disminuida durante una duración prolongada, por ejemplo, al menos una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas o más. Por ejemplo, en ciertos casos, la expresión del gen Serpina1 se suprime al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % o el 55 % por administración de un agente de ARNi descrito en el presente documento. En algunas implementaciones, el gen Serpina1 se suprime al menos aproximadamente el 60 %, 70 % o el 80 % por administración del agente de ARNi. En algunas realizaciones, el gen Serpina1 se suprime al menos aproximadamente el 85 %, 90 % o el 95 % por administración del agente de ARNi.

Los agentes de ARNi de la invención pueden administrarse a un sujeto usando cualquier modo de administración conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraocular, intrabronquial, intrapleural, intraperitoneal, intrarterial, linfática, cerebrospinal, y cualquier combinación de los mismos. En realizaciones preferidas, los agentes de ARNi se administran por vía subcutánea.

La administración puede ser mediante una inyección de liberación prolongada. Una inyección de liberación prolongada puede liberar los agentes de ARNi de una forma coherente durante un periodo de tiempo prolongado. Así, una inyección de liberación prolongada puede reducir la frecuencia de dosificación necesaria para obtener un efecto deseado, por ejemplo, una inhibición deseada de Serpina1, o un efecto terapéutico o profiláctico. Una inyección de liberación prolongada puede también proporcionar concentraciones más coherentes en suero. Las inyecciones de liberación prolongada pueden incluir inyecciones subcutáneas o inyecciones intramusculares. La inyección de liberación prolongada puede ser una inyección subcutánea.

La administración puede ser mediante una bomba. La bomba puede ser una bomba externa o una bomba quirúrgicamente implantada. En ciertas implementaciones, la bomba es una bomba osmótica implantada por vía subcutánea. En otras implementaciones, la bomba es una bomba de infusión. Una bomba de infusión puede usarse para infusiones intravenosas, subcutáneas, arteriales o epidurales. En implementaciones preferidas, la bomba de infusión es una bomba de infusión subcutánea. En otras realizaciones, la bomba es una bomba quirúrgicamente implantada que administra el agente de iARN al hígado.

Otros modos de administración incluyen administración epidural, intracerebral, intracerebroventricular, nasal, intrarterial, intracardíaca, infusión intraósea, intratecal e intravítrea, y pulmonar. El modo de administración puede elegirse basándose en si se desea tratamiento local o sistémico y basándose en el área que va a tratarse. La vía y sitio de administración puede elegirse para potenciar el direccionamiento.

El método incluye administrar un agente de ARNi a una dosis suficiente para contener/disminuir los niveles de ARNm de Serpina1 durante al menos 5, más preferentemente 7, 10, 14, 21, 25, 30 o 40 días; y opcionalmente, administrar una segunda dosis única del agente de ARNi, en el que la segunda dosis única se administra al menos 5, más preferentemente 7, 10, 14, 21, 25, 30 o 40 días después de administrar la primera dosis única, inhibiendo así la expresión del gen Serpina1 en un sujeto.

En una implementación, dosis de un agente de ARNi de la invención se administran no más de una vez cada cuatro semanas, no más de una vez cada tres semanas, no más de una vez cada dos semanas, o no más de una vez cada semana. En otra implementación, las administraciones pueden mantenerse durante uno, dos, tres o seis meses, o un año o más.

En general, el agente de ARNi no activa el sistema inmunitario, por ejemplo, no aumenta los niveles de citocinas, tales como niveles de TNF-alfa o IFN-alfa. Por ejemplo, cuando se mide por un ensayo, tal como un ensayo de

PBMC *in vitro*, tal como se describe en el presente documento, el aumento en los niveles de TNF-alfa o IFN-alfa es inferior al 30 %, 20 % o el 10 % de las células de control tratadas con un agente de ARNi de control, tal como un agente de ARNi que no se dirige a Serpina1.

Por ejemplo, un sujeto puede administrarse con una cantidad terapéutica de un agente de ARNi, tal como 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg o 2,5 mg/kg de ARNbc. El agente de ARNi puede administrarse por infusión intravenosa durante un periodo de tiempo, tal como durante un periodo de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos o 25 minutos. La administración se repite, por ejemplo, regularmente, tal como cada dos semanas (es decir, cada dos semanas) durante un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses o más. Después de una pauta de tratamiento inicial, los tratamientos pueden administrarse menos frecuentemente. Por ejemplo, después de la administración cada dos semanas durante tres meses, la administración puede repetirse una vez al mes, durante seis meses o un año o más. La administración del agente de ARNi puede reducir los niveles de Serpina1, por ejemplo, en una célula, tejido, sangre, orina, órgano (por ejemplo, el hígado), u otro compartimento del paciente al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % o más.

Antes de la administración de una dosis completa del agente de ARNi, los pacientes pueden administrarse con una dosis más pequeña, y monitorizarse para efectos adversos, tales como una reacción alérgica, o para niveles de lípidos o tensión arterial elevados. En otro ejemplo, el paciente puede monitorizarse para efectos inmunoestimulantes no deseados, tales como elevados niveles de citocinas (por ejemplo, TNF-alfa o INF-alfa). Una dosis más pequeña a modo de ejemplo es una que produce una incidencia de reacción por infusión inferior o igual al 5 %.

La eficacia de tratamiento o la prevención de enfermedad pueden evaluarse, por ejemplo, midiendo la progresión de la enfermedad, remisión de la enfermedad, gravedad de síntomas, reducción en el dolor, calidad de vida, dosis de una medicación requerida para sostener un efecto del tratamiento, nivel de un marcador de enfermedad o cualquier otro parámetro medible apropiado para una enfermedad dada que está tratándose o elegida para prevención. Está perfectamente dentro de la capacidad de un experto en la materia monitorizar la eficacia de tratamiento o la prevención midiendo uno cualquiera de tales parámetros, o cualquier combinación de parámetros. Por ejemplo, pueden evaluarse la eficacia de tratamiento de fibrosis hepática o mejora de la fibrosis hepática, por ejemplo, por monitorización periódica de marcadores de fibrosis hepática: a-2-macroglobulina (a-MA), transferrina, apolipoproteína AI, ácido hialurónico (HA), laminina, procolágeno III del extremo N (PIIINP), 7S colágeno IV (7S-IV), bilirrubina total, bilirrubina indirecta, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), AST/ALT, g-glutamyl transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (ALP), albúmina, albúmina/globulina, nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina (Cr), triglicérido, colesterol, lipoproteína de alta densidad y lipoproteína de baja densidad y biopsia de punción del hígado. Pueden medirse marcadores de fibrosis hepática y/o puede realizarse biopsia de punción del hígado antes del tratamiento (lecturas iniciales) y posteriormente (lecturas posteriores) durante la pauta de tratamiento.

Comparaciones de las lecturas posteriores con las lecturas iniciales proporcionan a un médico una indicación de si el tratamiento es eficaz. Está perfectamente dentro de la capacidad de un experto en la materia monitorizar la eficacia de tratamiento o la prevención midiendo uno cualquiera de tales parámetros, o cualquier combinación de parámetros. A propósito de la administración de un agente de ARNi que se dirige a Serpina1 o composición farmacéutica de la misma, "eficaz contra" una enfermedad asociada a Serpina1, tal como una enfermedad del hígado, por ejemplo, una afección de fibrosis hepática, indica que la administración de un agente de ARNi de la invención en una manera clínicamente apropiada produce un efecto beneficioso para al menos una fracción estadísticamente significativa de pacientes, tal como una mejora de síntomas, una cura, una reducción en la carga de enfermedad, reducción en masa tumoral o números de células, extensión de vida, mejora en la calidad de vida, u otro efecto generalmente reconocido como positivo por los doctores médicos familiarizados con el tratamiento de enfermedades del hígado.

En los métodos, un agente de ARNi como se describe en el presente documento puede usarse para tratar individuos que tienen los signos, síntomas y/o marcadores de, o que están diagnosticados con, o que están en riesgo de tener una enfermedad asociada a Serpina1, tal como una enfermedad del hígado, por ejemplo, inflamación del hígado, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular. Un experto en la materia puede monitorizar fácilmente los signos, síntomas y/o marcadores de tales trastornos en sujetos que reciben tratamiento con un agente de ARNi como se describe en el presente documento y ensayar una reducción en estos signos, síntomas y/o marcadores de al menos el 10 % y preferentemente a un nivel clínico que represente un riesgo bajo de enfermedad del hígado.

Es evidente un efecto del tratamiento o preventivo cuando hay una mejora estadísticamente significativa en uno o más parámetros del estado de enfermedad, o por una imposibilidad para empeorar o desarrollar síntomas que de otro modo se anticiparían. Como un ejemplo, un cambio favorable de al menos el 10 % en un parámetro medible de enfermedad (tal como una función hepática descrita anteriormente), y preferentemente al menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más, puede ser indicativo de tratamiento eficaz. La eficacia para un agente de ARNi dado de la invención o formulación de ese agente de ARNi también puede determinarse usando un modelo animal experimental para la enfermedad dada como se conoce en la técnica. Si se usa un modelo animal experimental, la eficacia del tratamiento se prueba cuando se observa una reducción estadísticamente significativa en un marcador o síntoma.

Un efecto del tratamiento o preventivo es evidente cuando uno o más síntomas se reducen o alivian. Por ejemplo, un tratamiento o preventivo es eficaz cuando se reducen o alivian uno o más de debilidad, fatiga, pérdida de peso, náuseas, vómitos, hinchazón abdominal, hinchazón de extremidades, picor excesivo e ictericia de los ojos y/o piel.

- 5 Para ciertas indicaciones, la eficacia puede medirse por un aumento en los niveles en suero de proteína Serpina1. Como un ejemplo, un aumento de los niveles en suero de Serpina1 apropiadamente plegada de al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 50 %, al menos el 100 %, al menos el 200 % más puede ser indicativo de tratamiento eficaz.

- 10 Alternativamente, la eficacia puede medirse por una reducción en la gravedad de la enfermedad como se ha determinado por un experto en la materia del diagnóstico basándose en una escala de clasificación de la gravedad de enfermedad clínicamente aceptada, pero como un ejemplo la puntuación de Child-Pugh (algunas veces la puntuación de Child-Turcotte-Pugh). En este ejemplo, el pronóstico de la enfermedad hepática crónica, principalmente cirrosis, se mide por una puntuación general de cinco medidas clínicas, bilirrubina, albúmina de suero, INR, ascitis y encefalopatía hepática. A cada marcador se le asigna un valor de 1-3, y el valor total se usa para proporcionar una puntuación clasificada como A (5-6 puntos), B (7-9 puntos) o C (10-15 puntos), que puede correlacionarse con tasas de supervivencia de uno y dos años. Métodos de determinación y análisis de las puntuaciones de Child-Pugh son muy conocidos en la técnica (Farnsworth et al, Am J Surgery 2004 188:580-583; Child and Turcotte. Surgery and portal hypertension. en: The liver and portal hypertension. Editado por CG Child. Philadelphia: Saunders 1964:50- 64; Pugh et al., Br J Surg 1973;60:648-52). La eficacia puede medirse en este ejemplo por el movimiento de un paciente desde, por ejemplo, una "B" a una "A". Cualquier cambio positivo que produzca, por ejemplo, reducción de la gravedad de la enfermedad medida usando la escala apropiada, representa tratamiento adecuado usando ARNi o una formulación de ARNi como se describe en el presente documento.

- 25 En una implementación, el agente de iARN se administra a una dosis de entre aproximadamente 0,25 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg, por ejemplo, entre aproximadamente 0,25 mg/kg y aproximadamente 0,5 mg/kg, entre aproximadamente 0,25 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg, entre aproximadamente 0,25 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg, entre aproximadamente 0,25 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 5 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg, entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg, entre aproximadamente 15 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg, entre aproximadamente 20 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg, entre aproximadamente 25 mg/kg y aproximadamente 35 mg/kg, o entre aproximadamente 40 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg.

- 30 En algunas implementaciones, el agente de iARN se administra a una dosis de aproximadamente 0,25 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 11 mg/kg, aproximadamente 12 mg/kg, aproximadamente 13 mg/kg, aproximadamente 14 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 16 mg/kg, aproximadamente 17 mg/kg, aproximadamente 18 mg/kg, aproximadamente 19 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 21 mg/kg, aproximadamente 22 mg/kg, aproximadamente 23 mg/kg, aproximadamente 24 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 26 mg/kg, aproximadamente 27 mg/kg, aproximadamente 28 mg/kg, aproximadamente 29 mg/kg, 30 mg/kg, aproximadamente 31 mg/kg, aproximadamente 32 mg/kg, aproximadamente 33 mg/kg, aproximadamente 34 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 36 mg/kg, aproximadamente 37 mg/kg, aproximadamente 38 mg/kg, aproximadamente 39 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 41 mg/kg, aproximadamente 42 mg/kg, aproximadamente 43 mg/kg, aproximadamente 44 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 46 mg/kg, aproximadamente 47 mg/kg, aproximadamente 48 mg/kg, aproximadamente 49 mg/kg o aproximadamente 50 mg/kg.

- 45 En ciertas implementaciones, por ejemplo, cuando un agente de iARN bicatenario incluye modificaciones (por ejemplo, uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, incluyendo un motivo tal en o cerca del sitio de escisión del agente), seis enlaces fosforotioato, y un ligando, un agente tal se administra a una dosis de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,09 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,08 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,07 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,06 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 0,09 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 0,08 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 0,07 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 0,06 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 0,09 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 0,08 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 0,07 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 0,06 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 0,04 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg a aproximadamente 0,03 mg/kg.

0,05 mg/kg, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,04 mg/kg a aproximadamente 0,09 mg/kg, aproximadamente 0,04 mg/kg a aproximadamente 0,08 mg/kg, aproximadamente 0,04 mg/kg a aproximadamente 0,07 mg/kg, aproximadamente 0,04 mg/kg a aproximadamente 0,06 mg/kg, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 0,09 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 0,08 mg/kg, o aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 0,07 mg/kg.

Valores e intervalos intermedios a los valores citados anteriores también pretenden ser parte de la presente divulgación, por ejemplo, el agente de iARN puede administrarse al sujeto a una dosis de aproximadamente 0,015 mg/kg a aproximadamente 0,45 mg/mg.

Por ejemplo, el agente de iARN, por ejemplo, el agente de iARN en una composición farmacéutica, puede administrarse a una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg, 0,0125 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,0175 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,0225 mg/kg, 0,025 mg/kg, 0,0275 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,0325 mg/kg, 0,035 mg/kg, 0,0375 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,0425 mg/kg, 0,045 mg/kg, 0,0475 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,0525 mg/kg, 0,055 mg/kg, 0,0575 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,0625 mg/kg, 0,065 mg/kg, 0,0675 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,0725 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,0775 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,0825 mg/kg, 0,085 mg/kg, 0,0875 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,0925 mg/kg, 0,095 mg/kg, 0,0975 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,125 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,175 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,225 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,275 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,325 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,375 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,425 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,475 mg/kg, o aproximadamente 0,5 mg/kg. Valores intermedios a los valores citados anteriores también pretenden ser parte de la presente divulgación.

La dosis de un agente de iARN que se administra a un sujeto puede adaptarse para equilibrar los riesgos y beneficios de una dosis particular, por ejemplo, para lograr un nivel deseado de supresión del gen *Serpina1* (como se evalúa, por ejemplo, basándose en la supresión de ARNm de *Serpina1*, la expresión de proteínas *Serpina1*, o una reducción en los niveles de lípidos) o un efecto terapéutico o profiláctico deseado, mientras que al mismo tiempo se evitan efectos secundarios no deseados.

En algunas implementaciones, el agente de iARN se administra en dos o más dosis. Si se desea facilitar infusiones repetidas o frecuentes, puede ser recomendable la implantación de un dispositivo de administración, por ejemplo, una bomba, prótesis endovascular semi-permanente (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intracisternal o intracapsular), o depósito. En algunas implementaciones, el número o cantidad de dosis posteriores depende del logro de un efecto deseado, por ejemplo, la supresión de un gen *Serpina1*, o el logro de un efecto terapéutico o profiláctico, por ejemplo, reducir un síntoma de una enfermedad del hígado. En algunas implementaciones, el agente de iARN se administra según un programa. Por ejemplo, el agente de iARN puede administrarse una vez por semana, dos veces por semana, tres veces por semana, cuatro veces por semana o cinco veces por semana. En algunas realizaciones, el programa implica administraciones regularmente separadas, por ejemplo, cada hora, cada cuatro horas, cada seis horas, cada ocho horas, cada doce horas, diariamente, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, semanalmente, cada dos semanas o mensualmente. En otras implementaciones, el programa implica administraciones estrechamente separadas, seguido de un periodo de tiempo más largo durante el cual el agente no se administra. Por ejemplo, el programa puede implicar un conjunto inicial de dosis que se administran en un periodo de tiempo relativamente corto (por ejemplo, aproximadamente cada 6 horas, aproximadamente cada 12 horas, aproximadamente cada 24 horas, aproximadamente cada 48 horas o aproximadamente cada 72 horas), seguido de un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas o aproximadamente 8 semanas) durante el cual el agente de iARN no se administra. En una implementación, el agente de iARN se administra inicialmente cada hora y después se administra a un mayor intervalo (por ejemplo, diariamente, semanalmente, cada dos semanas o mensualmente). En otra implementación, el agente de iARN se administra inicialmente diariamente y después se administra a un intervalo más grande (por ejemplo, semanalmente, bisemanalmente o mensualmente). En ciertas implementaciones, el intervalo más largo aumenta con el tiempo o se determina basándose en el logro de un efecto deseado. En una implementación específica, el agente de iARN se administra una vez al día durante una primera semana, seguido de dosificación semanal empezando en el octavo día de la administración. En otra implementación específica, el agente de iARN se administra cada dos días durante una primera semana, seguido de dosificación semanal empezando en el octavo día de administración.

En algunas implementaciones, el agente de iARN se administra en una pauta de dosificación que incluye una "fase de carga" de administraciones estrechamente separadas que puede ir seguida de una "fase de mantenimiento", en la que el agente de iARN se administra a intervalos más separados. En una implementación, la fase de carga comprende cinco administraciones diarias del agente de iARN durante la primera semana. En otra realización, la fase de mantenimiento comprende una o dos administraciones semanales del agente de iARN. En otra realización, la fase de mantenimiento dura durante 5 semanas. En una implementación, la fase de carga comprende la administración de una dosis de 2 mg/kg, 1 mg/kg o 0,5 mg/kg cinco veces a la semana. En otra implementación, la fase de mantenimiento comprende la administración de una dosis de 2 mg/kg, 1 mg/kg o 0,5 mg/kg una vez o dos veces a la semana.

Cualquiera de estos programas puede repetirse opcionalmente una o más iteraciones. El número de iteraciones puede depender del logro de un efecto deseado, por ejemplo, la supresión de un gen *Serpina1*, y/o el logro de un efecto terapéutico o profiláctico, por ejemplo, reducir los niveles de colesterol en suero o reducir un síntoma de una enfermedad asociada a *Serpina1*, por ejemplo, una enfermedad del hígado.

- 5 También se describe un método de enseñar al usuario final, por ejemplo, un cuidador o un sujeto, cómo administrar un agente de ARNi descrito en el presente documento. El método incluye, opcionalmente, proporcionar al usuario final una o más dosis del agente de ARNi, e instruir al usuario final a administrar el agente de ARNi en una pauta descrita en el presente documento, enseñando así al usuario final.

- 10 La predisposición genética desempeña una función en el desarrollo de enfermedades asociadas a genes diana, por ejemplo, enfermedad del hígado. Por tanto, un paciente en necesidad de un ARNip puede identificarse tomando una historia familiar, o, por ejemplo, cribando uno o más marcadores genéticos o variantes. Por consiguiente, se describe un método de tratamiento de un paciente seleccionando un paciente basándose en que el paciente tiene una o más de una deficiencia de *Serpina1* o una variante de gen de deficiencia de *Serpina1*, por ejemplo, un alelo PIZ, PIS o PIM(Malton). El método incluye administrar al paciente un agente de ARNi en una cantidad terapéuticamente eficaz.

- 15 Un profesional sanitario, tal como un médico, enfermera o miembro de la familia, puede tomar una historia familiar antes de recetar o administrar un agente de ARNi de la invención. Además, puede realizarse una prueba para determinar un genotipo o fenotipo. Por ejemplo, puede realizarse una prueba de ADN en una muestra del paciente, por ejemplo, una muestra de sangre, para identificar el genotipo y/o fenotipo de *Serpina1* antes de administrar un ARNbc de *Serpina1* al paciente.

20 VI. Kits

- También se describen kits para usar cualquiera de los agentes de ARNi y/o realizar cualquiera de los métodos. Tales kits incluyen uno o más agentes de iARN e instrucciones para su uso, por ejemplo, instrucciones para inhibir la expresión de un *Serpina1* en una célula poniendo en contacto la célula con el (los) agente(s) de iARN en una cantidad eficaz para inhibir la expresión del *Serpina1*. Los kits pueden comprender opcionalmente además medios para poner en contacto la célula con el agente de iARN (por ejemplo, un dispositivo de inyección), o medios para medir la inhibición de *Serpina1* (por ejemplo, medios para medir la inhibición de ARNm de *Serpina1*). Tales medios para medir la inhibición de *Serpina1* pueden comprender un medio para obtener una muestra de un sujeto, tal como, por ejemplo, una muestra de plasma. Los kits pueden comprender opcionalmente además medios para administrar el (los) agente(s) de iARN a un sujeto o medios para determinar la cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz.

- A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento en la práctica o prueba de los ARNi y métodos, a continuación se describen métodos y materiales adecuados.

Ejemplos

Materiales y métodos

Se usaron los siguientes materiales y métodos en los ejemplos.

Diseño de ARNip

- 40 El gen *Serpina1* tiene múltiples transcritos alternos. Se llevó a cabo diseño de ARNip para identificar ARNip que se dirigen a todos los transcritos de *Serpina1* humanos y de mono cinomolgo (*Macaca fascicularis*; en lo sucesivo "cino") anotados en la base de datos NCBI Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Se usaron los siguientes transcritos humanos de la colección de NCBI RefSeq: Humano - NM_000295.4, NM_001002235.2, NM_001002236.2, NM_001127700.1, NM_001127701.1, NM_001127702.1, NM_001127703.1, NM_001127704.1, NM_001127705.1, NM_001127706.1, NM_001127707.1. Para identificar un transcrito de cino, el transcrito de mono rhesus (*Macaca mulatta*), XM_001099255.2, se alineó con el genoma de *M. fascicularis* usando la herramienta de alineamiento Spidey (www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/). El porcentaje de identidad global de transcritos de rhesus y cino fue del 99,6 %. El transcrito de cino se ensambló a mano para preservar los sitios de corte y empalme consenso y las regiones codificantes y no traducidas de longitud completa. El transcrito resultante tuvo 2064 nucleótidos de longitud.

Se diseñaron todos los dúplex de ARNip que compartieron el 100 % de identidad con todos los transcritos humanos y de cino enumerados.

- Se usaron quinientos ochenta y cinco ARNip candidatos en una búsqueda exhaustiva contra el transcriptoma humano (definido como el conjunto de registros de NM_ y XM_ dentro del conjunto de NCBI Refseq humano). Se sintetizaron un total de 48 oligonucleótidos de ARNip derivados sentido (21-meros) y 48 antisentido (23-meros) y

formaron dúplex. Una lista detallada de secuencias de hebras codificantes y no codificantes de Sepina1 se muestra en las Tablas 1 y 2.

Síntesis de ARNip

I. Procedimiento general de síntesis de ARN a escala pequeña y media

- 5 Se sintetizaron oligonucleótidos de ARN a escalas entre 0,2-500 μmol usando monómeros de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-O-t-butildimetilsilil-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidito comercialmente disponibles de uridina, 4-N-acetilcitidina, 6-N-benzoiadenosina y 2-N-isobutirilguanosina y los fosforamiditos de 2'-O-metilo y 2'-flúor correspondientes según protocolos de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida estándar. Se prepararon las disoluciones de amidito a concentración 0,1-0,15 M y se usó 5-etiltio-1H-tetrazol (0,25-0,6 M en acetonitrilo) como activador. Se introdujeron modificaciones del esqueleto de fosforotioato durante la síntesis usando disulfuro de fenilacetilo 0,2 M (PADS) en lutidina:acetonitrilo (1:1) (v/v) o 3-(dimetilaminometil)amino-3H-1,2,4-ditiazol-5-tiona (DDTT) 0,1 M en piridina para la etapa de oxidación. Después de completarse la síntesis, las secuencias se escindieron del soporte sólido y se desprotegieron usando metilamina seguido de trietilamina.3HF para eliminar cualquier grupo protector de 2'-O-t-butildimetilsililo presente.
- 10
- 15 Para escalas de síntesis entre 5-500 μmol y secuencias completamente modificadas en 2' (2'-flúor y/ o 2'-O-metilo o combinaciones las mismas), los oligonucleótidos se desprotegieron usando 3:1 (v/v) etanol y amoniaco acuoso concentrado (28-32 %) ya fuera a 35 °C 16 h o 55 °C durante 5,5 h. Antes de la desprotección del amoniaco, los oligonucleótidos se trataron con piperidina 0,5 M en acetonitrilo durante 20 min sobre el soporte sólido. Se analizaron los oligonucleótidos en bruto por CL-EM y HPLC de intercambio aniónico (IEX-HPLC). La purificación de los oligonucleótidos se llevó a cabo por IEX HPLC usando: fosfato 20 mM, 10 %-15 % de ACN, pH = 8,5 (tampón A) y fosfato 20 mM, 10 %-15 % de ACN, NaBr 1 M, pH = 8,5 (tampón B). Las fracciones se analizaron para pureza por HPLC analítica. Se reunieron las fracciones que contenían producto con pureza adecuada y se concentraron sobre un evaporador rotatorio antes de la desalación. Se desalaron las muestras por cromatografía de exclusión por tamaño y se liofilizaron a sequedad. Se hibridaron cantidades molares iguales de hebras codificantes y no codificantes en 1x tampón PBS para preparar los dúplex de ARNip correspondientes.
- 20
- 25

- Para escalas pequeñas (0,2-1 μmol), la síntesis se realizó en un sintetizador MerMade 192 en un formato de 96 pocillos. En caso de secuencias completamente modificadas en 2' (2'-flúor y/ o 2'-O-metilo o combinaciones las mismas), los oligonucleótidos se desprotegieron usando metilamina a temperatura ambiente durante 30-60 min seguido de incubación a 60 °C durante 30 min o usando 3:1 (v/v) de etanol y amoniaco acuoso concentrado (28-32 %) a temperatura ambiente durante 30-60 min seguido de incubación a 40 °C durante 1,5 horas. Entonces se precipitaron los oligonucleótidos en bruto en una disolución de acetonitrilo:acetona (9:1) y se aislaron por centrifugación y decantación del sobrenadante. El sedimento de oligonucleótidos en bruto se resuspendió en tampón NaOAc 20 mM y se analizó por CL-EM y HPLC de intercambio aniónico. Se desalaron las secuencias de oligonucleótidos en bruto en placas de 96 pocillos profundos en una columna de 5 ml HiTrap Sephadex G25 (GE Healthcare). En cada pocillo se recogieron aproximadamente 1,5 ml de muestras correspondientes a una secuencia individual. Estos oligonucleótidos desalados purificados se analizaron por CL-EM y cromatografía de intercambio aniónico. Se prepararon dúplex hibridando cantidades equimolares de secuencias sentido y antisentido en un robot Tecan. La concentración de dúplex se ajustó a 10 μM en 1x tampón PBS.
- 30
- 35

II. Síntesis de oligonucleótidos conjugados con GalNAc para análisis *in vivo*

- 40 Se sintetizaron oligonucleótidos conjugados con el ligando GalNAc en su extremo 3' a escalas entre 0,2-500 μmol usando un soporte sólido pre-cargado con un conector en forma de Y que llevaba un grupo hidroxilo primario protegido con 4,4'-dimetoxitritilo (DMT) para la síntesis de oligonucleótidos y un ligando GalNAc unido mediante un anclaje.
- Para la síntesis de conjugados de GalNAc en las escalas entre 5-500 μmol , se siguió el protocolo de síntesis anterior para ARN con las siguientes adaptaciones: Para soportes de síntesis basados en poliestireno se usó 5 % de ácido dicloroacético en tolueno para la escisión de DMT durante la síntesis. La escisión del soporte y desprotección se realizó como se ha descrito anteriormente. Se sintetizaron secuencias ricas en fosforotioato (normalmente > 5 fosforotioatos) sin eliminar el grupo 5'-DMT terminal ("DMT sobre") y, después de la escisión y desprotección como se ha descrito anteriormente, se purificaron por HPLC de fase inversa usando acetato de amonio 50 mM en agua (tampón A) y acetato de amonio 50 mM en 80 % de acetonitrilo (tampón B). Las fracciones se analizaron para pureza por HPLC analítica y/o CL-EM. Se reunieron las fracciones que contenían producto con pureza adecuada y se concentraron en un evaporador rotatorio. Se eliminó el grupo de DMT usando 20 %-25 % de ácido acético en agua hasta la completitud. Se desalaron las muestras por cromatografía de exclusión por tamaño y se liofilizaron a sequedad. Se hibridaron cantidades molares iguales de hebras codificantes y no codificantes en 1x tampón PBS para preparar los dúplex de ARNip correspondientes.
- 45
- 50
- 55 Para síntesis a pequeña escala de conjugados de GalNAc (0,2-1 μmol), que incluyen secuencias con múltiples enlaces fosforotioato, se aplicaron los protocolos descritos anteriormente para la síntesis de ARN o secuencias que contienen completamente 2'-F/2'-OMe en la plataforma MerMade. La síntesis se realizó en pre-columnas rellenas que contenían soporte de vidrio de poro controlado funcionalizado con GalNAc.

Síntesis de ADNc usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad de ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat N.º 4368813)

- Se añadió una mezcla maestra de 2 µl de 10X tampón, 0,8 µl de 25X dNTP, 2 µl de cebadores aleatorios, 1 µl de transcriptasa inversa, 1 µl de inhibidor de RNasa y 3,2 µl de H₂O por reacción en 10 µl de ARN total. Se generó ADNc usando un ciclador térmico Bio-Rad C-1000 o S-1000 (Hercules, CA) mediante las siguientes etapas: 25 °C 10 min, 37 °C 120 min, 85 °C 5 s, 4 °C mantenimiento.

Cultivo celular y transfecciones

- Se cultivaron células Hep3B, HepG2 o HeLa (ATCC, Manassas, VA) a casi confluencia a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ en medio recomendado (ATCC) complementado con 10 % de FBS y glutamina (ATCC) antes de desprenderse de la placa por tripsinización. Para los dúplex cribados en formato de 96 pocillos, la transfección se llevó a cabo añadiendo 44,75 µl de Opti-MEM más 0,25 µl de Lipofectamine RNAiMax por pocillo (Invitrogen, Carlsbad CA. Cat N.º 13778-150) a 5 µl de cada dúplex de ARNip a un pocillo individual en una placa de 96 pocillos. A continuación, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se añadieron cincuenta µl de medio de crecimiento completo sin antibiótico que contenía $\sim 2 \times 10^4$ células a la mezcla de ARNip. Para los dúplex cribados en formato de 384 pocillos, se mezclaron 5 µl de Opti-MEM más 0,1 µl de Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad CA. Cat N.º 13778-150) con 5 µl de cada dúplex de ARNip por pocillo individual. A continuación, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, seguido de la adición de 40 µl de medio de crecimiento completo sin antibiótico que contenía $\sim 8 \times 10^3$ células. Las células se incubaron durante 24 horas antes de la purificación del ARN. Se realizaron experimentos de dosis única a concentración del dúplex final de 10 nM y 0,1 nM y se hicieron experimentos de dosis-respuesta a concentración del dúplex final de 10, 1,67, 0,27, 0,046, 0,0077, 0,0013, 0,00021, 0,00004 nM.

Transfección de captación libre

- Se combinaron cinco µl de cada ARNip conjugado con GalNac en PBS con 3×10^4 hepatocitos de mono cinomolgo criopreservados recientemente descongelados (In Vitro Technologies-Celsis, Baltimore, MD; lote N.º JQD) resuspendidos en 95 µl de medio In Vitro Gro CP (In Vitro Technologies-Celsis, Baltimore, MD) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos o 5 µl de ARNip y 45 µl de medio que contenía $1,2 \times 10^3$ células para el formato de placa de 384 pocillos. La mezcla se incubó durante aproximadamente 24 horas a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Los ARNip se probaron a concentraciones finales de 500 y 10 nM.

Aislamiento de ARN total usando el kit de aislamiento de ARNm DYNABEADS (Invitrogen, pieza N.º: 610-12)

- Se recogieron células y se lisaron en 150 µl de tampón de lisis/unión, a continuación se mezclaron durante 5 minutos a 850 rpm usando una mezcladora térmica de Eppendorf (la velocidad de mezcla fue la misma durante todo el proceso). Se añadieron diez microlitros de perlas magnéticas y 80 µl de mezcla de tampón de lisis/unión a una placa de fondo redondo y se mezclaron durante 1 minuto. Las perlas magnéticas se capturaron usando un mecano magnético y el sobrenadante se extrajo sin alterar las perlas. Después de extraer el sobrenadante, las células lisadas se añadieron a las perlas restantes y se mezclaron durante 5 minutos. Después de extraer el sobrenadante, las perlas magnéticas se lavaron 2 veces con 150 µl de tampón de lavado A y se mezclaron durante 1 minuto. Las perlas se capturaron de nuevo y se extrajo el sobrenadante. A continuación, las perlas se lavaron con 150 µl de tampón de lavado B, se capturaron y se extrajo el sobrenadante. A continuación, las perlas se lavaron con 150 µl de tampón de elución, se capturaron y se extrajo el sobrenadante. Las perlas se dejaron secar durante 2 minutos. Después de secar, se añadieron 50 µl de tampón de elución y se mezclaron durante 5 minutos a 70 °C. Las perlas se capturaron con un imán durante 5 minutos. Se extrajeron cincuenta µl de sobrenadante y se añadieron a otra placa de 96 pocillos.

- Para el formato de 384 pocillos, las células se lisaron durante un minuto mediante la adición de 50 µl de tampón de lisis/unión. Se usaron dos µl de perlas magnéticas por pocillo. Se tomó en alícuotas el volumen requerido de perlas, se capturó sobre un mecano magnético y se extrajo la disolución de almacenamiento de perlas. A continuación, las perlas se resuspendieron en el volumen requerido de tampón de lisis/unión (25 µl por pocillo) y se añadieron 25 µl de suspensión de perlas a las células lisadas. La mezcla de lisado-perla se incubó durante 10 minutos en VibraTranslator al parámetro N.º 7 (Union Scientific Corp., Randallstown, MD). Posteriormente, las perlas se capturaron usando un mecano magnético, se extrajo el sobrenadante y las perlas se lavaron una vez con 90 µl de tampón A, seguido de etapas de lavado individuales con 90 µl de tampón B y 100 µl de tampón de elución. Las perlas se pusieron en remojo en cada tampón de lavado durante ~ 1 minuto (no implicó mezcla). Después de la etapa de lavado final, las perlas se resuspendieron en 15 µl de tampón de elución durante 5 minutos a 70 °C, seguido de la captura de perlas y la extracción del sobrenadante (hasta 8 µl) para la síntesis de ADNc y/o almacenamiento de ARN purificado (-20 °C).

PCR en tiempo real

Se añadieron dos µl de ADNc a una mezcla maestra que contenía 0,5 µl de sonda TaqMan de GAPDH humana (catálogo de Applied Biosystems N.º 4326317E), 0,5 µl de sonda TaqMan de SERPINA1 (catálogo de Applied Biosystems N.º Hs00165475_m1) para experimentos de Hep3B o con ensayos de Taqman para GAPDH y

SERPINA1 diseñados a medida para experimentos de PCH y 5 µl de mezcla maestra de la sonda Lightcycler 480 (catálogo de Roche N.º 04887301001) por pocillo en placas de 384 pocillos (catálogo de Roche N.º 04887301001). Se hizo PCR en tiempo real en un sistema de PCR en tiempo real LC480 de Roche (Roche). Cada dúplex se probó en al menos dos transfecciones independientes con dos duplicados biológicos cada uno, y cada transfección se ensayó por duplicado.

Para calcular el cambio de veces relativo, se analizaron datos en tiempo real usando el método $\Delta\Delta Ct$ y se normalizaron a los ensayos realizados con células transfectadas con AD-19 5510 nM, o células transfectadas con vector vacío. Para los ensayos de captación libre, los datos se normalizaron a células tratadas con PBS o GalNAc-1955 (mayor concentración usada para compuestos experimentales). Se calcularon CI_{50} usando un modelo de ajuste de 4 parámetros usando XLFit y se normalizaron a células transfectadas con AD-1955 durante el mismo intervalo de dosis, o a su propia dosis más baja.

Las secuencias sentido y antisentido de AD-1955 son: SENTIDO: 5'-cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT-3' (SEQ ID NO: 33); y ANTISENTIDO: 5'-UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT-3' (SEQ ID NO: 40).

Los cebadores Taqman y sondas usados fueron los siguientes:

Cebadores y sondas de TaqMan para Serpina1 y Gapdh de cinomolgo:

Serpina1: Cebador directo: ACTAAGGTCTTCAGCAATGGG (SEQ ID NO: 34); Cebador inverso: GCTTCAGTCCCTTTCTCATCG (SEQ ID NO: 35); sonda de TaqMan: TGGTCAGCACAGCCTTATGCACG (SEQ ID NO: 36)

Gapdh: Cebador directo: GCATCCTGGGCTACACTGA (SEQ ID NO: 37); Cebador inverso: TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC (SEQ ID NO: 38); sonda de TaqMan: CCAGGTGGTCTCTCTCC (SEQ ID NO: 39)

Tabla B: Abreviaturas de monómeros de nucleótido usados en la representación de secuencias de ácidos nucleicos.

Abreviatura	Nucleótido(s)
A	Adenosina-3'-fosfato
Af	2'-fluoroadenosina-3'-fosfato
Afs	2'-fluoroadenosina-3'-fosforotioato
As	adenosina-3'-fosforotioato
c	citidina-3'-fosfato
Cf	2'-fluorocitidina-3'-fosfato
Cfs	2'-fluorocitidina-3'-fosforotioato
Cs	citidina-3'-fosforotioato
G	guanosina-3'-fosfato
Gf	2'-fluoroguanosina-3'-fosfato
Gfs	2'-fluoroguanosina-3'-fosforotioato
Gs	guanosina-3'-fosforotioato
T	5'-metiluridina-3'-fosfato
Tf	2'-fluoro-5-metiluridina-3'-fosfato
Tfs	2'-fluoro-5-metiluridina-3'-fosforotioato
Ts	5-metiluridina-3'-fosforotioato
U	uridina-3'-fosfato
Uf	2'-fluorouridina-3'-fosfato
Ufs	2'-fluorouridina-3'-fosforotioato

Abreviatura	Nucleótido(s)
Us	uridina-3'-fosforotioato
N	cualquier nucleótido (G, A, C, T o U)
a	2'-O-metiladenosina-3'-fosfato
as	2'-O-metiladenosina-3'-fosforotioato
c	2'-O-metilcitidina-3'-fosfato
cs	2'-O-metilcitidina-3'-fosforotioato
g	2'-O-metilguanosina-3'-fosfato
gs	2'-O-metilguanosina-3'-fosforotioato
t	2'-O-metil-5-metiluridina-3'-fosfato
ts	2'-O-metil-5-metiluridina-3'-fosforotioato
u	2'-O-metiluridina-3'-fosfato
us	2'-O-metiluridina-3'-fosforotioato
dT	2'-desoxitimidina
dTs	2'-desoxitimidina-3'-fosforotioato
dU	2'-desoxiuridina
s	enlace fosforotioato
L96	N-[tris(GalNAc-alquil)-amidodecanoil]-4-hidroxiiprolinol Hyp-(GalNAc-alquilo) ₃
I	inosina-3'-fosfato
Is	inosina-3'-fosforotioato
dI	2'-desoxirriboinosina
dIs	2'-desoxiinosina-3'-fosforotioato
Y34	2-hidroximetil-tetrahidrofurano-4-metoxi-3-fosfato (2'-OMe furanosa abásica)
Y34s	2-hidroximetil-tetrahidrofurano-4-metoxi-3-fosforotioato (2'-OMe furanosa abásica)
P	5'-fosfato

Ejemplo 1. *Síntesis de oligonucleótidos conjugados con GalNAc*

Se diseñaron una serie de dúplex de ARNip que abarcan la secuencia de ARNm de *Serpina1*, se sintetizaron y conjugaron un GalNAc trivalente en el extremo 3 de la hebra codificante usando las técnicas descritas anteriormente. Las secuencias de estos dúplex se muestran en la Tabla 1. Estas mismas secuencias también se sintetizaron con diversas modificaciones de nucleótidos y se conjugaron con un GalNAc trivalente. Las secuencias de los dúplex modificados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Secuencias sin modificar de Serpina1

Nombre del dúplex	Nombre del oligonucleótido sentido	Sec trans sentido	SEQ ID NO:	Posición en NM_000295.4	Nombre del oligonucleótido antisentido	Sec trans antisentido	SEQ ID NO:	Posición en NM_000295.4
AD-58681.1	A-119065.1	GUCCAACAGCACCAAU AUCUU	41	469-489	A-119066.1	AAGAUUUUGGUCUGU UGGACUG	129	467-489
AD-59084.1	A-119065.2	GUCCAACAGCACCAAU AUCUU	42	469-489	A-119941.1	AAGAUUUUGGUCUGU UGGACUG	130	467-489
AD-59060.2	A-119933.1	UAAUGAUUGAACAAAA UACCA	43	1455-1475	A-119934.1	UGGUAUUUUGUUCAAU CAUUAAG	131	1453-1475
AD-59060.1	A-119933.1	UAAUGAUUGAACAAAA UACCA	44	1455-1475	A-119934.1	UGGUAUUUUGUUCAAU CAUUAAG	132	1453-1475
AD-59054.2	A-119931.1	CUUCUUAUUGAUUGAA CAAAA	45	1450-1470	A-119932.1	UUUUGUUCAAUUAUAA GAAGAC	133	1448-1470
AD-59054.1	A-119931.1	CUUCUUAUUGAUUGAA CAAAA	46	1450-1470	A-119932.1	UUUUGUUCAAUUAUAA GAAGAC	134	1448-1470
AD-59072.2	A-119937.1	AUUGAACAAAAUACCA AGUCU	47	1460-1480	A-119938.1	AGACUUGGUUUUUUGU UCAAUCA	135	1458-1480
AD-59072.1	A-119937.1	AUUGAACAAAAUACCA AGUCU	48	1460-1480	A-119938.1	AGACUUGGUUUUUUGU UCAAUCA	136	1458-1480
AD-59048.2	A-119929.1	UUCUUAUUGAUUGAAC AAAAU	49	1451-1471	A-119930.1	AUUUUGUUCAAUUAUUA AGAAAGA	137	1449-1471
AD-59048.1	A-119929.1	UUCUUAUUGAUUGAAC AAAAU	50	1451-1471	A-119930.1	AUUUUGUUCAAUUAUUA AGAAAGA	138	1449-1471
AD-59062.2	A-119964.1	CAAAACCUUUUGUCUUU CUUAAU	51	1438-1458	A-119965.1	AUUAAGAAGACAAAAGGG UUUGUU	139	1436-1458
AD-59062.1	A-119964.1	CAAAACCUUUUGUCUUU CUUAAU	52	1438-1458	A-119965.1	AUUAAGAAGACAAAAGGG UUUGUU	140	1436-1458
AD-59078.2	A-119939.1	UGUCUUCUUAUUGAU UGAAC	53	1447-1467	A-119940.1	UGUUCAAUUAUUAAGAA GACAAA	141	1445-1467

Nombre del dúplex	Nombre del oligonucleótido sentido	Sec trans sentido	SEQ ID NO:	Posición en NM_000295.4	Nombre del oligonucleótido antisentido	Sec trans antisentido	SEQ ID NO:	Posición en NM_000295.4
AD-59078.1	A-119939.1	UGUCUUUCUUAUAGAU UGAAC	54	1447-1467	A-119940.1	UGUUCAAUUAUAGAA GACAAA	142	1445-1467
AD-59056.2	A-119962.1	CACCUGGAAAAUGAAC UCACC	55	1121-1141	A-119963.1	GGUGAGUUAUUUUCC AGGUGCU	143	1119-1141
AD-59056.1	A-119962.1	CACCUGGAAAAUGAAC UCACC	56	1121-1141	A-119963.1	GGUGAGUUAUUUUCC AGGUGCU	144	1119-1141
AD-59091.2	A-119958.1	UUUUGCUCUGGUGAA UUACAU	57	880-900	A-119959.1	AUGUAAUUCACCAGAGC AAAAAC	145	878-900
AD-59091.1	A-119958.1	UUUUGCUCUGGUGAA UUACAU	58	880-900	A-119959.1	AUGUAAUUCACCAGAGC AAAAAC	146	878-900
AD-59083.2	A-120018.1	ACCCUUUGUCUUCUU AAUGAU	59	1441-1461	A-120019.1	AUCAUUAAAGAGACAAA GGGUUU	147	1439-1461
AD-59083.1	A-120018.1	ACCCUUUGUCUUCUU AAUGAU	60	1441-1461	A-120019.1	AUCAUUAAAGAGACAAA GGGUUU	148	1439-1461
AD-59073.2	A-119952.1	UUGAACAAAAUACCAA GUCUC	61	1461-1481	A-119953.1	GAGACUUUGUAUUUUUG UUCAAUC	149	1459-1481
AD-59073.1	A-119952.1	UUGAACAAAAUACCAA GUCUC	62	1461-1481	A-119953.1	GAGACUUUGUAUUUUUG UUCAAUC	150	1459-1481
AD-59066.2	A-119935.1	GUUCAACAAACCCUUU GUCUU	63	1432-1452	A-119936.1	AAGACAAAAGGGUUUUGU UGAACUU	151	1430-1452
AD-59066.1	A-119935.1	GUUCAACAAACCCUUU GUCUU	64	1432-1452	A-119936.1	AAGACAAAAGGGUUUUGU UGAACUU	152	1430-1452
AD-59059.2	A-120010.1	AAAUACCAAGUCUCCCC CUCUU	65	1468-1488	A-120011.1	AAGAGGGGAGACUUGG UAUUUUU	153	1466-1488
AD-59059.1	A-120010.1	AAAUACCAAGUCUCCCC CUCUU	66	1468-1488	A-120011.1	AAGAGGGGAGACUUGG UAUUUUU	154	1466-1488
AD-59070.2	A-119998.1	UUUUUGCUCUGGUGA AUUACA	67	879-899	A-119999.1	UGUAAUUCACCAGAGCA AAAAACU	155	877-899

Nombre del dúplex	Nombre del oligonucleótido sentido	Sec trans sentido	SEQ ID NO:	Posición en NM_000295.4	Nombre del oligonucleótido antisentido	Sec trans antisentido	SEQ ID NO:	Posición en NM_000295.4
AD-59070.1	A-11998.1	UUUUUGCUCUGGUGA AUUACA	68	879-899	A-11999.1	UGUAAUUCACCAGAGCA AAAACU	156	877-899
AD-59063.2	A-119980.1	AGUUCACACAAACCCUU UGUCU	69	1431-1451	A-119981.1	AGACAAAGGGUUUGUU GAACUUG	157	1429-1451
AD-59063.1	A-119980.1	AGUUCACACAAACCCUU UGUCU	70	1431-1451	A-119981.1	AGACAAAGGGUUUGUU GAACUUG	158	1429-1451
AD-59069.2	A-119982.1	AAUGAUUGAACACAAAU ACCAA	71	1456-1476	A-119983.1	UUGGUUUUUUGUUCAA UCAUUAA	159	1454-1476
AD-59069.1	A-119982.1	AAUGAUUGAACACAAAU ACCAA	72	1456-1476	A-119983.1	UUGGUUUUUUGUUCAA UCAUUAA	160	1454-1476
AD-59082.2	A-120002.1	UACUGGAACCUAUGA UCUGAA	73	1216-1236	A-120003.1	UUCAGAUCAUAGGUUC CAGUAAU	161	1214-1236
AD-59082.1	A-120002.1	UACUGGAACCUAUGA UCUGAA	74	1216-1236	A-120003.1	UUCAGAUCAUAGGUUC CAGUAAU	162	1214-1236
AD-59088.2	A-120004.1	ACAUUAAAGAAAGGGUU GAGCU	75	1576-1596	A-120005.1	AGCUCACCCCUUCUUUA AUGUCA	163	1574-1596
AD-59088.1	A-120004.1	ACAUUAAAGAAAGGGUU GAGCU	76	1576-1596	A-120005.1	AGCUCACCCCUUCUUUA AUGUCA	164	1574-1596
AD-59080.2	A-119970.1	AAAAUUGUGGAUUUG GUCAAG	77	839-859	A-119971.1	CUUGACCAAAUCCACAA UUUUCC	165	837-859
AD-59080.1	A-119970.1	AAAAUUGUGGAUUUG GUCAAG	78	839-859	A-119971.1	CUUGACCAAAUCCACAA UUUUCC	166	837-859
AD-59058.2	A-119994.1	AUUACUGGAACCUAU GAUCUG	79	1214-1234	A-119995.1	CAGAUCAUAGGUUCCA GUAAUGG	167	1212-1234
AD-59058.1	A-119994.1	AUUACUGGAACCUAU GAUCUG	80	1214-1234	A-119995.1	CAGAUCAUAGGUUCCA GUAAUGG	168	1212-1234
AD-59090.2	A-119942.1	CACAGUUUUUGCUCU GGUGAA	81	874-894	A-119943.1	UUCACCAGAGCAAAAC UGUGUC	169	872-894

Nombre del dúplex	Nombre del oligonucleótido sentido	Sec trans sentido	SEQ ID NO:	Posición en NM_000295.4	Nombre del oligonucleótido antisentido	Sec trans antisentido	SEQ ID NO:	Posición en NM_000295.4
AD-59090.1	A-119942.1	CACAGUUUUUGCUCU GGUGAA	82	874-894	A-119943.1	UUCACCAGAGCAAAAAC UGUGUC	170	872-894
AD-59057.2	A-119978.1	UUAAAAGAGGGUUUGA GCUGGU	83	1579-1599	A-119979.1	ACCAGCUCACCCCUUCU UUAUUG	171	1577-1599
AD-59057.1	A-119978.1	UUAAAAGAGGGUUUGA GCUGGU	84	1579-1599	A-119979.1	ACCAGCUCACCCCUUCU UUAUUG	172	1577-1599
AD-59051.2	A-119976.1	AGUGAGCAUCGCUAC AGCCUU	85	499-519	A-119977.1	AAGGCUGUAGCGAUGC UCACUGG	173	497-519
AD-59051.1	A-119976.1	AGUGAGCAUCGCUAC AGCCUU	86	499-519	A-119977.1	AAGGCUGUAGCGAUGC UCACUGG	174	497-519
AD-59065.2	A-120012.1	AAGGAGCUUGACAGA GACACA	87	857-877	A-120013.1	UGUGUCUCUGUCAAGC UCCUUGA	175	855-877
AD-59065.1	A-120012.1	AAGGAGCUUGACAGA GACACA	88	857-877	A-120013.1	UGUGUCUCUGUCAAGC UCCUUGA	176	855-877
AD-59087.2	A-119988.1	GUGGAUAAGUUUUUG GAGGAU	89	716-736	A-119989.1	AUCCUCCAAAAACUUUAU CCACUA	177	714-736
AD-59087.1	A-119988.1	GUGGAUAAGUUUUUG GAGGAU	90	716-736	A-119989.1	AUCCUCCAAAAACUUUAU CCACUA	178	714-736
AD-59075.2	A-119984.1	GAUUGAACAAAAUACC AAGUC	91	1459-1479	A-119985.1	GACUUGGUAUUUUGUU CAAUCAU	179	1457-1479
AD-59075.1	A-119984.1	GAUUGAACAAAAUACC AAGUC	92	1459-1479	A-119985.1	GACUUGGUAUUUUGUU CAAUCAU	180	1457-1479
AD-59092.2	A-119974.1	GCUCUCCAAGGCCGU GCAUAA	93	1321-1341	A-119975.1	UUAUGCACGGCCUUGG AGAGCUU	181	1319-1341
AD-59092.1	A-119974.1	GCUCUCCAAGGCCGU GCAUAA	94	1321-1341	A-119975.1	UUAUGCACGGCCUUGG AGAGCUU	182	1319-1341
AD-59081.2	A-119986.1	ACCUGGAAAAUGAACU CACCC	95	1122-1142	A-119987.1	GGGUGAGUUCUUUUUC CAGGUC	183	1120-1142

Nombre del dúplex	Nombre del oligonucleótido sentido	Sec trans sentido	SEQ ID NO:	Posición en NM_000295.4	Nombre del oligonucleótido antisentido	Sec trans antisentido	SEQ ID NO:	Posición en NM_000295.4
AD-59081.1	A-119986.1	ACCUGGAAAAUGAACU CACCC	96	1122-1142	A-119987.1	GGGUGAGUUAUUUUC CAGGUGC	184	1120-1142
AD-59064.2	A-119996.1	GGGACCAAGGCUGAC ACUCAC	97	536-556	A-119997.1	GUGAGUGUCAGCCUUG GUCCCCA	185	534-556
AD-59064.1	A-119996.1	GGGACCAAGGCUGAC ACUCAC	98	536-556	A-119997.1	GUGAGUGUCAGCCUUG GUCCCCA	186	534-556
AD-59052.2	A-119992.1	GCCAUGUUUUUAGAG GCCAUA	99	1385-1405	A-119993.1	UAUGGCCUCUAAAAACA UGGCCC	187	1383-1405
AD-59052.1	A-119992.1	GCCAUGUUUUUAGAG GCCAUA	100	1385-1405	A-119993.1	UAUGGCCUCUAAAAACA UGGCCC	188	1383-1405
AD-59076.2	A-120000.1	CCUGGAAAAUGAACUC ACCCA	101	1123-1143	A-120001.1	UGGGUGAGUUAUUU CCAGGUG	189	1121-1143
AD-59076.1	A-120000.1	CCUGGAAAAUGAACUC ACCCA	102	1123-1143	A-120001.1	UGGGUGAGUUAUUU CCAGGUG	190	1121-1143
AD-59068.2	A-119966.1	AAGAGGCCCAAGAAACA GAUCA	103	789-809	A-119967.1	UGAUCUGUUUCUUGGC CUCUUCG	191	787-809
AD-59068.1	A-119966.1	AAGAGGCCCAAGAAACA GAUCA	104	789-809	A-119967.1	UGAUCUGUUUCUUGGC CUCUUCG	192	787-809
AD-59089.2	A-120020.1	GGCAAAUGGGAGAGA CCCUUU	105	911-931	A-120021.1	AAAGGGUCUCUCCCAU UUGCCUU	193	909-931
AD-59089.1	A-120020.1	GGCAAAUGGGAGAGA CCCUUU	106	911-931	A-120021.1	AAAGGGUCUCUCCCAU UUGCCUU	194	909-931
AD-59093.2	A-119990.1	UGGGAAAAGUGGUGA AUCCCA	107	1491-1511	A-119991.1	UGGGAUUAUCCACUUU UCCCAUG	195	1489-1511
AD-59093.1	A-119990.1	UGGGAAAAGUGGUGA AUCCCA	108	1491-1511	A-119991.1	UGGGAUUAUCCACUUU UCCCAUG	196	1489-1511
AD-59061.2	A-119948.1	GGGGACCAAGGCUGA CACUCA	109	535-555	A-119949.1	UGAGUGUCAGCCUUGG UCCCCAG	197	533-555

Nombre del dúplex	Nombre del oligonucleótido sentido	Sec trans sentido	SEQ ID NO:	Posición en NM_000295.4	Nombre del oligonucleótido antisentido	Sec trans antisentido	SEQ ID NO:	Posición en NM_000295.4
AD-59061.1	A-119948.1	GGGACCAAGGCUGA CACUCA	110	535-555	A-119949.1	UGAGUGUCAGCCUUGG UCCCCAG	198	533-555
AD-59074.2	A-119968.1	GACAUUAAAGAAGGG UUGAGC	111	1575-1595	A-119969.1	GCUCAACCCUUCUUUAA UGUCAU	199	1573-1595
AD-59074.1	A-119968.1	GACAUUAAAGAAGGG UUGAGC	112	1575-1595	A-119969.1	GCUCAACCCUUCUUUAA UGUCAU	200	1573-1595
AD-59079.2	A-119954.1	GGCCAUUUUUUAGA GGCCAU	113	1384-1404	A-119955.1	AUGGCCUCUAAAAACAU GGCCCC	201	1382-1404
AD-59079.1	A-119954.1	GGCCAUUUUUUAGA GGCCAU	114	1384-1404	A-119955.1	AUGGCCUCUAAAAACAU GGCCCC	202	1382-1404
AD-59071.2	A-120014.1	UUCUGCCUGAUGAG GGGAAA	115	1094-1114	A-120015.1	UUUCCCUCAUCAGGC AGGAAGA	203	1092-1114
AD-59071.1	A-120014.1	UUCUGCCUGAUGAG GGGAAA	116	1094-1114	A-120015.1	UUUCCCUCAUCAGGC AGGAAGA	204	1092-1114
AD-59086.2	A-119972.1	CUCUCCAAGGCCGUG CAUAA	117	1322-1342	A-119973.1	CUUAUGCACGGCCUUG GAGAGCU	205	1320-1342
AD-59086.1	A-119972.1	CUCUCCAAGGCCGUG CAUAA	118	1322-1342	A-119973.1	CUUAUGCACGGCCUUG GAGAGCU	206	1320-1342
AD-59094.2	A-120006.1	AGCUCUCCAAGGCCG UGCAUA	119	1320-1340	A-120007.1	UAUGCACGGCCUUGGA GAGCUUC	207	1318-1340
AD-59094.1	A-120006.1	AGCUCUCCAAGGCCG UGCAUA	120	1320-1340	A-120007.1	UAUGCACGGCCUUGGA GAGCUUC	208	1318-1340
AD-59085.2	A-119956.1	UCCUGGAGGCCCUGA AUUUCA	121	564-584	A-119957.1	UGAAAUUCAGGCCCUUC CAGGAUU	209	562-584
AD-59085.1	A-119956.1	UCCUGGAGGCCCUGA AUUUCA	122	564-584	A-119957.1	UGAAAUUCAGGCCCUUC CAGGAUU	210	562-584
AD-59067.2	A-119950.1	UUGGUCAAGGAGCUU GACAGA	123	851-871	A-119951.1	UCUGUCAAGCUCCUUG ACCAAAU	211	849-871

Nombre del dúplex	Nombre del oligonucleótido sentido	Sec trans sentido	SEQ ID NO:	Posición en NM_000295.4	Nombre del oligonucleótido antisentido	Sec trans antisentido	SEQ ID NO:	Posición en NM_000295.4
AD-59067.1	A-119950.1	UUUGGUCAAGGAGCUU GACAGA	124	851-871	A-119951.1	UCUGUCAAGCUCCUUG ACCAAAU	212	849-871
AD-59053.2	A-120008.1	UUUGGUCAAGGAGCU UGACAG	125	850-870	A-120009.1	CUGUCAAGCUCCUUGA CCAAAU	213	848-870
AD-59053.1	A-120008.1	UUUGGUCAAGGAGCU UGACAG	126	850-870	A-120009.1	CUGUCAAGCUCCUUGA CCAAAU	214	848-870
AD-59077.2	A-120016.1	UCCCCAGUGAGCAUC GCUACA	127	494-514	A-120017.1	UGUAGCGAUGCUCACU GGGGAGA	215	492-514
AD-59077.1	A-120016.1	UCCCCAGUGAGCAUC GCUACA	128	494-514	A-120017.1	UGUAGCGAUGCUCACU GGGGAGA	216	492-514

Tabla 2. Secuencias modificadas de Serpina1

Nombre del dúplex	Nombre del oligonucleótido sentido	Secuencia de oligonucleótidos sentido	SEQ ID NO:	Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia de oligonucleótidos antisentido	SEQ ID NO:
AD-59081.1	A-119065.1	GfsusCfcAfaCfaGfcCfcAfaAfuCfuUfL96	217	A-119066.1	asAfsGAFuAFuUfgGfugcUfgUfuGfgAfcsUfsg	305
AD-59084.1	A-119065.2	GfsusCfcAfaCfaGfcCfcAfaAfuCfuUfL96	218	A-119941.1	asAfsGAFuAFuUfgGfugcUfgUfuGfgAfcsusg	306
AD-59060.2	A-119933.1	UfsasAfuGfaUfuGfAfAfcAfaAfaUfaCfcAfL96	219	A-119934.1	usGfsgUfaUfuUfuGfuucAfaUfcAfuUfasasg	307
AD-59060.1	A-119933.1	UfsasAfuGfaUfuGfAfAfcAfaAfaUfaCfcAfL96	220	A-119934.1	usGfsgUfaUfuUfuGfuucAfaUfcAfuUfasasg	308
AD-59054.2	A-119931.1	CfsusUfcUfuAfaUfgGfAfUfgAfaCfaAfaAfL96	221	A-119932.1	usUfsuUfgUfuCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc	309
AD-59054.1	A-119931.1	CfsusUfcUfuAfaUfgGfAfUfgAfaCfaAfaAfL96	222	A-119932.1	usUfsuUfgUfuCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc	310
AD-59072.2	A-119937.1	AfsusUfgAfaCfaAfAfAfUfcCfaAfgUfcUfL96	223	A-119938.1	asGfsaCfuUfgGfuAfuuuUfgUfuCfaAfuscscsa	311
AD-59072.1	A-119937.1	AfsusUfgAfaCfaAfAfAfUfcCfaAfgUfcUfL96	224	A-119938.1	asGfsaCfuUfgGfuAfuuuUfgUfuCfaAfuscscsa	312
AD-59048.2	A-119929.1	UfsusCfuUfaAfuGfAfUfuGfaAfcAfaAfaUfL96	225	A-119930.1	asUfsuUfuGfuUfcAfaucAfuUfaAfgAfasgsa	313
AD-59048.1	A-119929.1	UfsusCfuUfaAfuGfAfUfuGfaAfcAfaAfaUfL96	226	A-119930.1	asUfsuUfuGfuUfcAfaucAfuUfaAfgAfasgsa	314
AD-59062.2	A-119964.1	CfsasAfaCfcCfuUfUfGfuCfuUfcUfuAfaUfL96	227	A-119965.1	asUfsuAfaGfaAfgAfcaAfgGfgUfuUfgsusu	315
AD-59062.1	A-119964.1	CfsasAfaCfcCfuUfUfGfuCfuUfcUfuAfaUfL96	228	A-119965.1	asUfsuAfaGfaAfgAfcaAfgGfgUfuUfgsusu	316
AD-59078.2	A-119939.1	UfsgsUfcUfuCfuUfAfAfUfuGfaUfuGfaAfcAfL96	229	A-119940.1	usGfsuUfcAfaUfcAfuuaAfgAfaGfaCfasasa	317

Nombre del dúplex	Nombre del oligonucleótido sentido	Secuencia de oligonucleótidos sentido	SEQ ID NO:	Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia de oligonucleótidos antisentido	SEQ ID NO:
AD-59078.1	A-119939.1	UfsgsUfcUfuCfuUfaAfAfAfGfaUfuGfaAfcAfL96	230	A-119940.1	usGfsuUfcAfaUfcAfuuaAfgAfaGfaCfasasa	318
AD-59056.2	A-119962.1	CfsasCfcUfgGfaAfAfAfAfGfaAfcUfcAfcCfL96	231	A-119963.1	gsGfsuGfaGfuUfcAfuuuUfcCfaGfgUfgscsu	319
AD-59056.1	A-119962.1	CfsasCfcUfgGfaAfAfAfAfGfaAfcUfcAfcCfL96	232	A-119963.1	gsGfsuGfaGfuUfcAfuuuUfcCfaGfgUfgscsu	320
AD-59091.2	A-119958.1	UfsusUfuGfcUfcUfGfGfuGfaAfuUfaCfaUfL96	233	A-119959.1	asUfsgUfaAfuUfcAfccaGfaGfcAfaAfasc	321
AD-59091.1	A-119958.1	UfsusUfuGfcUfcUfGfGfuGfaAfuUfaCfaUfL96	234	A-119959.1	asUfsgUfaAfuUfcAfccaGfaGfcAfaAfasc	322
AD-59083.2	A-120018.1	AfscsCfcUfuUfgUfCfUfuCfuUfaAfuGfaUfL96	235	A-120019.1	asUfscAfuUfaAfgAfagaCfaAfaGfgGfususu	323
AD-59083.1	A-120018.1	AfscsCfcUfuUfgUfCfUfuCfuUfaAfuGfaUfL96	236	A-120019.1	asUfscAfuUfaAfgAfagaCfaAfaGfgGfususu	324
AD-59073.2	A-119952.1	UfsusGfaAfcAfaAfAfUfaCfcAfaGfuCfuCfL96	237	A-119953.1	gsAfsgAfcUfuGfgUfauuUfuGfuUfcAfasc	325
AD-59073.1	A-119952.1	UfsusGfaAfcAfaAfAfUfaCfcAfaGfuCfuCfL96	238	A-119953.1	gsAfsgAfcUfuGfgUfauuUfuGfuUfcAfasc	326
AD-59066.2	A-119935.1	GfsusUfcAfaCfaAfAfCfcCfuUfuGfuCfuUfL96	239	A-119936.1	asAfsgAfcAfaAfgGfguuUfgUfuGfaAfcusu	327
AD-59066.1	A-119935.1	GfsusUfcAfaCfaAfAfCfcCfuUfuGfuCfuUfL96	240	A-119936.1	asAfsgAfcAfaAfgGfguuUfgUfuGfaAfcusu	328
AD-59059.2	A-120010.1	AfsasAfuAfcCfaAfGfUfcUfcCfcCfuUfL96	241	A-120011.1	asAfsgAfgGfgGfaGfacuUfgGfuAfuUfususg	329
AD-59059.1	A-120010.1	AfsasAfuAfcCfaAfGfUfcUfcCfcCfuUfL96	242	A-120011.1	asAfsgAfgGfgGfaGfacuUfgGfuAfuUfususg	330
AD-59070.2	A-119998.1	UfsusUfuUfgCfuCfuUfGfgUfgAfaUfaAfcAfL96	243	A-119999.1	usGfsuAfaUfuCfaCfcagAfgCfaAfaAfascsu	331

Nombre del dúplex	Nombre del oligonucleótido sentido	Secuencia de oligonucleótidos sentido	SEQ ID NO:	Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia de oligonucleótidos antisentido	SEQ ID NO:
AD-59070.1	A-119998.1	UfsusUfuUfgCfuCfUfGfGfUfgAfaUfuAfcAfl96	244	A-119999.1	usGfsuAfaUfuCfaCfcagAfgCfaAfaAfascsu	332
AD-59063.2	A-119980.1	AfsgsUfuCfaAfcAfaAfcAfcCfcUfuUfgUfcUfl96	245	A-119981.1	asGfsaCfaAfaGfgGfuuuGfuUfgAfaCfusug	333
AD-59063.1	A-119980.1	AfsgsUfuCfaAfcAfaAfcAfcCfcUfuUfgUfcUfl96	246	A-119981.1	asGfsaCfaAfaGfgGfuuuGfuUfgAfaCfusug	334
AD-59069.2	A-119982.1	AfsasUfgAfuUfgAfaAfcAfaAfaAfuAfcCfaAfl96	247	A-119983.1	usUfsgGfuAfuUfuUfguuCfaAfuCfaUfusasa	335
AD-59069.1	A-119982.1	AfsasUfgAfuUfgAfaAfcAfaAfaAfuAfcCfaAfl96	248	A-119983.1	usUfsgGfuAfuUfuUfguuCfaAfuCfaUfusasa	336
AD-59082.2	A-120002.1	UfsasCfuGfgAfaCfcUfaUfgAfuCfuGfaAfl96	249	A-120003.1	usUfscAfgAfuCfaUfaggUfuCfcAfgUfasasu	337
AD-59082.1	A-120002.1	UfsasCfuGfgAfaCfcUfaUfgAfuCfuGfaAfl96	250	A-120003.1	usUfscAfgAfuCfaUfaggUfuCfcAfgUfasasu	338
AD-59088.2	A-120004.1	AfscsAfuUfaAfaGfaAfgGfgUfuGfaGfcUfl96	251	A-120005.1	asGfscUfcAfaCfcCfuucUfuUfaAfuGfuscsa	339
AD-59088.1	A-120004.1	AfscsAfuUfaAfaGfaAfgGfgUfuGfaGfcUfl96	252	A-120005.1	asGfscUfcAfaCfcCfuucUfuUfaAfuGfuscsa	340
AD-59080.2	A-119970.1	AfsasAfaUfuGfuGfGfAfuUfuGfgUfcAfaGfl96	253	A-119971.1	csUfsuGfaCfcAfaAfuuccAfcAfaUfuUfuscs	341
AD-59080.1	A-119970.1	AfsasAfaUfuGfuGfGfAfuUfuGfgUfcAfaGfl96	254	A-119971.1	csUfsuGfaCfcAfaAfuuccAfcAfaUfuUfuscs	342
AD-59058.2	A-119994.1	AfsusUfaCfuGfgAfaCfcUfaUfgAfuCfuGfl96	255	A-119995.1	csAfsuAfuCfaUfaGfguuCfcAfgUfaAfusgsg	343
AD-59058.1	A-119994.1	AfsusUfaCfuGfgAfaCfcUfaUfgAfuCfuGfl96	256	A-119995.1	csAfsuAfuCfaUfaGfguuCfcAfgUfaAfusgsg	344
AD-59090.2	A-119942.1	CfsasCfaGfuUfuUfGfGfcUfcUfgGfuGfaAfl96	257	A-119943.1	usUfscAfcCfaGfaGfaaAfaAfcUfgUfgsus	345

Nombre del dúplex	Nombre del oligonucleótido sentido	Secuencia de oligonucleótidos sentido	SEQ ID NO:	Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia de oligonucleótidos antisentido	SEQ ID NO:
AD-59090.1	A-119942.1	CfsasCfaGfuUfuUfGfcUfcUfgGfuGfaAfl96	258	A-119943.1	usUfscAfcCfaGfaGfcaAfaAfcUfgUfgsusc	346
AD-59057.2	A-119978.1	UfsusAfaAfgAfaGfGfGfuUfgAfgCfuGfgUfl96	259	A-119979.1	asCfscAfgCfuCfaAfcccUfuCfuUfuAfasug	347
AD-59057.1	A-119978.1	UfsusAfaAfgAfaGfGfGfuUfgAfgCfuGfgUfl96	260	A-119979.1	asCfscAfgCfuCfaAfcccUfuCfuUfuAfasug	348
AD-59051.2	A-119976.1	AfsgsUfgAfgCfaUfCfGfcUfaCfaGfcCfuUfl96	261	A-119977.1	asAfsgGfcUfgUfaGfegaUfgCfuCfaCfusgsg	349
AD-59051.1	A-119976.1	AfsgsUfgAfgCfaUfCfGfcUfaCfaGfcCfuUfl96	262	A-119977.1	asAfsgGfcUfgUfaGfegaUfgCfuCfaCfusgsg	350
AD-59065.2	A-120012.1	AfsasGfgAfgCfuUfGfAfcAfgAfgAfcAfl96	263	A-120013.1	usGfsuGfuCfuCfuGfucaAfgCfuCfcUfusgsa	351
AD-59065.1	A-120012.1	AfsasGfgAfgCfuUfGfAfcAfgAfgAfcAfl96	264	A-120013.1	usGfsuGfuCfuCfuGfucaAfgCfuCfcUfusgsa	352
AD-59087.2	A-119988.1	GfsusGfgAfuAfaGfuUfuUfuGfgAfgGfaUfl96	265	A-119989.1	asUfscCfuCfcAfaAfaacUfuAfuCfcAfcusa	353
AD-59087.1	A-119988.1	GfsusGfgAfuAfaGfuUfuUfuGfgAfgGfaUfl96	266	A-119989.1	asUfscCfuCfcAfaAfaacUfuAfuCfcAfcusa	354
AD-59075.2	A-119984.1	GfsasUfuGfaAfcAfaAfaUfaCfcAfaGfuCfl96	267	A-119985.1	gsAfscUfuGfgUfaUfuuuGfuUfcAfaUfcsasu	355
AD-59075.1	A-119984.1	GfsasUfuGfaAfcAfaAfaUfaCfcAfaGfuCfl96	268	A-119985.1	gsAfscUfuGfgUfaUfuuuGfuUfcAfaUfcsasu	356
AD-59092.2	A-119974.1	GfscsUfcCfaAfcGfGfcCfuUfgCfaUfaAfl96	269	A-119975.1	usUfsaUfgCfaCfgGfcccUfgGfaGfaGfcsusu	357
AD-59092.1	A-119974.1	GfscsUfcCfaAfcGfGfcCfuUfgCfaUfaAfl96	270	A-119975.1	usUfsaUfgCfaCfgGfcccUfgGfaGfaGfcsusu	358
AD-59081.2	A-119986.1	AfscsCfuGfgAfaAfaUfuUfgAfaCfuCfcCfl96	271	A-119987.1	gsGfsgUfgAfgUfuCfauuUfuCfcAfgGfusgsc	359

Nombre del dúplex	Nombre del oligonucleótido sentido	Secuencia de oligonucleótidos sentido	SEQ ID NO:	Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia de oligonucleótidos antisentido	SEQ ID NO:
AD-59081.1	A-119986.1	AfscsCfuGfgAfaAfAfUfgAfaCfuCfaCfcCfL96	272	A-119987.1	gsGfgUfgAfgUfuCfauuUfuCfcAfgGfusgsc	360
AD-59064.2	A-119996.1	GfsgsGfaCfcAfaGfGfCfuGfaCfaCfuCfaCfL96	273	A-119997.1	gsUfsgAfgUfgUfcAfgccUfuGfgUfcCfscsa	361
AD-59064.1	A-119996.1	GfsgsGfaCfcAfaGfGfCfuGfaCfaCfuCfaCfL96	274	A-119997.1	gsUfsgAfgUfgUfcAfgccUfuGfgUfcCfscsa	362
AD-59052.2	A-119992.1	GfscsCfaUfgUfuUfuUfaGfaGfgCfcAfuAfl96	275	A-119993.1	usAfsuGfgCfcUfcUfaaaAfaCfaUfgGfscsc	363
AD-59052.1	A-119992.1	GfscsCfaUfgUfuUfuUfaGfaGfgCfcAfuAfl96	276	A-119993.1	usAfsuGfgCfcUfcUfaaaAfaCfaUfgGfscsc	364
AD-59076.2	A-120000.1	CfscsUfgGfaAfaAfUfGfaAfcUfcAfcCfcAfl96	277	A-120001.1	usGfsgGfuGfaGfuUfcUfcUfcUfcCfaGfgsusg	365
AD-59076.1	A-120000.1	CfscsUfgGfaAfaAfUfGfaAfcUfcAfcCfcAfl96	278	A-120001.1	usGfsgGfuGfaGfuUfcUfcUfcUfcCfaGfgsusg	366
AD-59068.2	A-119966.1	AfsasGfaGfgCfcAfAfGfaAfaCfaGfaUfcAfl96	279	A-119967.1	usGfsaUfcUfgUfuUfcuuGfgCfcUfcUfscsg	367
AD-59068.1	A-119966.1	AfsasGfaGfgCfcAfAfGfaAfaCfaGfaUfcAfl96	280	A-119967.1	usGfsaUfcUfgUfuUfcuuGfgCfcUfcUfscsg	368
AD-59089.2	A-120020.1	GfsgsCfaAfaUfgGfGfAfGfAfcCfcUfuUfl96	281	A-120021.1	asAfsaGfgGfuCfuCfuuccCfaUfuUfgCfcsusu	369
AD-59089.1	A-120020.1	GfsgsCfaAfaUfgGfGfAfGfAfcCfcUfuUfl96	282	A-120021.1	asAfsaGfgGfuCfuCfuuccCfaUfuUfgCfcsusu	370
AD-59093.2	A-119990.1	UfsgsGfgAfaGfuUfGfgUfgAfaUfcCfcAfl96	283	A-119991.1	usGfsgGfaUfuCfaCfcacUfuUfuCfcCfcasug	371
AD-59093.1	A-119990.1	UfsgsGfgAfaGfuUfGfgUfgAfaUfcCfcAfl96	284	A-119991.1	usGfsgGfaUfuCfaCfcacUfuUfuCfcCfcasug	372
AD-59061.2	A-119948.1	GfsgsGfgAfcCfaAfGfGfcUfgAfcAfcUfcAfl96	285	A-119949.1	usGfsaGfuGfuCfaGfccUfgGfuCfcCfcsasg	373

Nombre del dúplex	Nombre del oligonucleótido sentido	Secuencia de oligonucleótidos sentido	SEQ ID NO:	Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia de oligonucleótidos antisentido	SEQ ID NO:
AD-59061.1	A-119948.1	GfsgsGfGfAfcCfaAfGfGfcUfgAfcAfcUfcAfl96	286	A-119949.1	usGfsaGfuGfuCfaGfccUfgGfuCfcCfcsasg	374
AD-59074.2	A-119968.1	GfsasCfaUfuAfaAfGfAfaGfgGfuUfgAfgCfl96	287	A-119969.1	gsCfsuCfaAfcCfcUfucuUfuAfaUfgUfcsasu	375
AD-59074.1	A-119968.1	GfsasCfaUfuAfaAfGfAfaGfgGfuUfgAfgCfl96	288	A-119969.1	gsCfsuCfaAfcCfcUfucuUfuAfaUfgUfcsasu	376
AD-59079.2	A-119954.1	GfsgsCfcAfuGfuUfuUfuAfgAfgGfcCfaUfl96	289	A-119955.1	asUfsgGfcCfuCfuAfaaaAfcAfuGfgCfcscsc	377
AD-59079.1	A-119954.1	GfsgsCfcAfuGfuUfuUfuAfgAfgGfcCfaUfl96	290	A-119955.1	asUfsgGfcCfuCfuAfaaaAfcAfuGfgCfcscsc	378
AD-59071.2	A-120014.1	UfsusCfcUfgCfcUfGfAfuGfaGfgGfgAfaAfl96	291	A-120015.1	usUfsuUfcCfcUfcAfucaGfgCfaGfgAfsgsa	379
AD-59071.1	A-120014.1	UfsusCfcUfgCfcUfGfAfuGfaGfgGfgAfaAfl96	292	A-120015.1	usUfsuUfcCfcUfcAfucaGfgCfaGfgAfsgsa	380
AD-59086.2	A-119972.1	CfsusCfuCfcAfaGfGfCfcGfuGfcAfuAfaGfl96	293	A-119973.1	csUfsuAfuGfcAfcGfgccUfuGfgAfgAfgscsu	381
AD-59086.1	A-119972.1	CfsusCfuCfcAfaGfGfCfcGfuGfcAfuAfaGfl96	294	A-119973.1	csUfsuAfuGfcAfcGfgccUfuGfgAfgAfgscsu	382
AD-59094.2	A-120006.1	AfsgsCfuCfuCfcAfaGfGfCfcGfuGfcAfuAfl96	295	A-120007.1	usAfsuGfcAfcGfgCfcuuGfgAfgAfgCfususc	383
AD-59094.1	A-120006.1	AfsgsCfuCfuCfcAfaGfGfCfcGfuGfcAfuAfl96	296	A-120007.1	usAfsuGfcAfcGfgCfcuuGfgAfgAfgCfususc	384
AD-59085.2	A-119956.1	UfscsCfuGfgAfgGfGfCfcUfgAfaUfuUfcAfl96	297	A-119957.1	usGfsaAfaUfuCfaGfgccCfuCfcAfgGfasusu	385
AD-59085.1	A-119956.1	UfscsCfuGfgAfgGfGfCfcUfgAfaUfuUfcAfl96	298	A-119957.1	usGfsaAfaUfuCfaGfgccCfuCfcAfgGfasusu	386
AD-59067.2	A-119950.1	UfsusGfgUfcAfaGfGfAfgCfuUfgAfcAfgAfl96	299	A-119951.1	usCfsuGfuCfaAfgCfuuccUfuGfaCfcAfasasu	387

Nombre del dúplex	Nombre del oligonucleótido sentido	Secuencia de oligonucleótidos sentido	SEQ ID NO:	Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia de oligonucleótidos antisentido	SEQ ID NO:
AD-59067.1	A-119950.1	UfsusGfgUfcAfaGfGfAfgCfuUfgAfcAfgAfl96	300	A-119951.1	usCfsuGfuCfaAfgCfuuccUfuGfaCfcAfasasu	388
AD-59053.2	A-120008.1	UfsusUfgGfuCfaAfGfGfaGfcUfuGfaCfaGfl96	301	A-120009.1	csUfsgUfcAfaGfcUfccuUfgAfcCfaAfasusc	389
AD-59053.1	A-120008.1	UfsusUfgGfuCfaAfGfGfaGfcUfuGfaCfaGfl96	302	A-120009.1	csUfsgUfcAfaGfcUfccuUfgAfcCfaAfasusc	390
AD-59077.2	A-120016.1	UfscsCfcCfaGfuGfAfGfcAfuCfGcfuAfcAfl96	303	A-120017.1	usGfsuAfgCfGcfuAfuGfcucAfcUfgGfgGfasgsa	391
AD-59077.1	A-120016.1	UfscsCfcCfaGfuGfAfGfcAfuCfGcfuAfcAfl96	304	A-120017.1	usGfsuAfgCfGcfuAfuGfcucAfcUfgGfgGfasgsa	392

Ejemplo 2. Cribado *in vitro* e *in vivo*.

Se evaluó un subconjunto de estos dúplex para eficacia en ensayos de dosis única como se ha descrito anteriormente. La Tabla 3 muestra los resultados de un cribado de dosis única en hepatocitos primarios de ratón (Hep3b) transfectados con los ARNi modificados conjugados con GalNAC indicados y los resultados de cribado por captación libre de dosis única en hepatocitos primarios de *Cynomolgus* (PCH) con los ARNi modificados conjugados con GalNAC indicados. Los datos se expresan como fracción de mensajero que queda con respecto a las células tratadas con AD-1955, un control no de direccionamiento para experimentos de Hep3B, o con respecto a células intactas para experimentos de PCH.

Tabla 3. Cribado de eficacia de Serpina1 por captación libre en células Hep3b primarias y en hepatocitos primarios de mono *Cynomolgus* (PCH).

	Transfección (Hep3b)				Captación libre (PCH)			
	10 nM		0,1 nM		10 nM		500 nM	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
AD-58681	2,7	0,8	4,2	0,5	72,7	9,8	42,1	4,6
AD-59084	2,1	0,2	6,2	0,6	74,5	10,1	54,2	13,3
AD-59060	1,2	0,4	6,5	0,3	87,4	8,7	69,5	4,5
AD-59054	2,2	1,4	7,2	0,7	59,1	10,8	50,3	5,0
AD-59072	1,3	0,3	7,7	0,2	87,6	6,4	86,2	9,9
AD-59048	1,1	0,4	8,1	0,4	72,9	19,5	46,4	5,8
AD-59062	1,4	0,0	9,2	0,6	77,9	11,6	64,9	11,0
AD-59078	1,8	0,0	12,1	0,2	89,2	9,3	71,1	3,2
AD-59056	1,8	0,1	20,2	1,8	88,9	13,4	83,7	8,5
AD-59091	3,8	0,5	26,6	4,1	89,7	15,0	75,6	7,5
AD-59083	2,3	0,6	27,2	2,5	94,5	9,1	74,5	11,9
AD-59073	3,7	0,7	27,3	2,3	101,5	15,7	85,1	18,9
AD-59066	5,9	1,7	31,5	3,4	106,2	25,3	28,2	27,1
AD-59059	2,9	0,7	32,9	3,4	101,3	10,4	84,9	18,0
AD-59070	7,4	1,0	33,9	6,6	87,5	9,3	80,1	13,2
AD-59063	3,0	0,3	35,0	3,9	99,3	4,9	91,1	7,9
AD-59069	5,6	0,5	39,6	3,5	90,5	19,6	100,4	7,3
AD-59082	5,0	2,3	41,3	1,8	89,2	27,3	87,8	3,9
AD-59088	5,2	0,2	41,5	2,1	96,4	17,1	96,2	18,2
AD-59080	8,2	1,8	41,8	2,1	94,3	4,9	93,4	15,0
AD-59058	6,4	0,7	43,9	0,3	112,1	12,7	92,5	8,6
AD-59090	5,8	0,5	44,8	0,8	119,3	14,6	100,2	26,7
AD-59057	6,2	0,3	47,5	0,9	95,2	7,8	76,1	5,8
AD-59051	7,0	0,3	52,2	4,4	89,4	2,8	82,0	13,6
AD-59065	12,7	1,4	60,1	4,4	94,1	9,7	90,6	5,9

	Transfección (Hep3b)				Captación libre (PCH)			
	10 nM		0,1 nM		10 nM		500 nM	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
AD-59087	7,7	1,0	62,1	4,7	92,3	6,8	72,6	10,4
AD-59075	9,3	2,3	62,9	2,0	101,7	10,6	99,0	18,8
AD-59092	14,6	4,0	65,5	1,7	87,4	17,3	94,1	21,2
AD-59081	10,9	2,3	68,2	2,4	115,1	18,4	106,1	11,8
AD-59064	11,0	0,1	71,6	4,5	91,3	14,7	87,2	10,3
AD-59052	21,8	2,6	78,6	2,4	99,9	9,2	88,9	17,5
AD-59076	14,5	4,2	79,4	1,5	84,9	27,2	101,7	10,8
AD-59068	48,1	1,6	81,8	2,5	100,2	19,7	107,1	25,8
AD-59089	30,4	0,6	82,6	9,0	87,3	11,9	89,1	3,7
AD-59093	23,5	0,2	85,2	5,4	72,1	48,5	103,0	13,2
AD-59061	38,1	2,2	86,5	4,4	100,3	13,3	102,3	9,0
AD-59074	38,9	5,4	86,6	3,0	106,5	10,3	100,6	14,7
AD-59079	45,1	0,8	87,6	4,8	100,5	17,4	92,1	33,3
AD-59071	58,6	1,0	96,2	7,1	82,3	25,8	110,7	2,2
AD-59086	78,3	1,1	96,3	4,1	93,1	7,3	97,1	17,0
AD-59094	96,6	2,7	102,1	0,8	75,2	52,7	76,9	7,9
AD-59085	99,3	3,7	102,5	4,4	94,1	10,0	102,4	16,3
AD-59067	88,7	0,8	103,7	0,9	118,5	17,2	108,9	30,3
AD-59053	98,5	4,7	103,7	1,9	98,7	14,8	96,4	8,1
AD-59077	100,5	8,2	104,8	1,6	88,0	32,5	88,1	4,1

Los valores de CI_{50} para dúplex seleccionados por transfección en Hep3B primarias se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores de CI_{50} de Serpina1 para dúplex seleccionados por transfección en la línea celular humana Hep3B.

Dúplex	CI_{50} (nM)
AD-58681	0,031
AD-59054	0,128
AD-59062	0,130
AD-59084	0,143
AD-59048	0,146
AD-59072	0,197
AD-59056	0,408
AD-59078	0,600

Dúplex	CI50 (nM)
AD-59066	0,819
AD-59060	1,883

Se evaluó un subconjunto de estos dúplex para eficacia *in vivo* en ratones transgénicos que expresaban la forma Z-AAT de Serpina1 humana (véase, por ejemplo, Dyaico, et al. (1988) Science 242:1409-12; Carlson, et al. (1989) J Clin Invest 83:1183-90; Perfumo, et al. (1994) Ann Hum Genet. 58:305-20. Esto es un modelo establecido de enfermedad del hígado asociada a deficiencia de AAT. Brevemente, se inyectaron ratones transgénicos por vía subcutánea con una dosis única de 20 mg/kg de ARNi enumerados en la Tabla 5 en el Día 0. Se recogió suero en los Días -10, -5, 0, 3, 5, 7, 10 y 17 y se determinó la cantidad de proteína Serpina1 circulante usando un ensayo de ELISA específico de ser humano. Los resultados de estos análisis se representan en la Figura 1. Como se indica en la Figura 1, AD-58681-6PS fue el más eficaz en reducir los niveles de proteína Serpina1 en suero en estos ratones.

Tabla 5.

AD-54330.2	A-111587.3	sentido	GfucCfcAfaCfaGfCfAfcCfaAfuAfuCfuUfL96 (SEQ ID NO: 393)
	A-111588.3	antisentido	aAfgAfuAfuUfgGfugcUfgUfuGfgAfcsUfsg (SEQ ID NO: 394)
AD-58681.1	A-119065.1	sentido	GfsusCfcAfaCfaGfCfAfcCfaAfuAfuCfuUfL96 (SEQ ID NO: 395)
	A-119066.1	antisentido	asAfsgAfuAfuUfgGfugcUfgUfuGfgAfcsUfsg (SEQ ID NO: 396)
AD-58682.1	A-119065.1	sentido	GfsusCfcAfaCfaGfCfAfcCfaAfuAfuCfuUfL96 (SEQ ID NO: 397)
	A-119067.1	antisentido	asAfsgAfsuAfsuUfgGfugcUfgUfsuGfgAfcsUfsg (SEQ ID NO: 398)
AD-58683.1	A-119068.1	sentido	GsusccAAcAGcAccAAuAucuuL96 (SEQ ID NO: 399)
	A-119067.1	antisentido	asAfsgAfsuAfsuUfgGfugcUfgUfsuGfgAfcsUfsg (SEQ ID NO: 400)

Ejemplo 3. Eficacia de si-AAT en ratones transgénicos.

Se probaron *in vivo* cinco dúplex de ARNip, como se describe en los ejemplos precedentes, con valores bajos de CI50 para eficacia. Se inyectaron los dúplex de ARNip a 10 mg/kg en ratones transgénicos que expresaban el alelo Z-AAT humano, un modelo establecido de enfermedad del hígado asociada a deficiencia de AAT. Los ratones se administraron en el día 0 y se siguió AAT humana en suero durante 21 días después de la dosis (Figura 2A). Cada punto representa un promedio de tres ratones y las barras de error reflejan la desviación estándar. Los ratones se sacrificaron en el día 21 y sus hígados se procesaron para medir niveles de ARNm. El gráfico muestra ARNm de hAAT normalizado a GAPDH para cada grupo (Figura 2B). Las barras reflejan el promedio y las barras de error reflejan la desviación estándar. Como se indica en las Figuras 2A y 2B, AD59054 fue el más eficaz en reducir los niveles de ARNm de hAAT en los ratones.

Ejemplo 4. Supresión de AAT duradera en un modo sensible a la dosis

Se midió la eficacia del dúplex de ARNip AD-59054 en el modelo de animal transgénico de enfermedad del hígado asociada a deficiencia de AAT por administración de diferentes dosis del dúplex de ARNip AD-59054 por vía subcutánea. Se extrajo suero en diferentes intervalos de tiempo para medir los niveles de proteína hAAT en suero usando ELISA específico de AAT humana. La curva de eficacia que muestra la máxima inactivación lograda en la prueba de diferentes dosis en ratones se representa en la Figura 3A. Cada punto es un promedio de tres animales y las barras de error representan la desviación estándar. La duración de la inactivación después de una dosis única de ARNip de AAT a 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg se muestra en la Figura 3B. Cada punto de datos es un promedio de tres animales y las barras de error reflejan la desviación estándar. Se normalizaron los niveles de hAAT al promedio de tres sangrados previos para cada animal. El ARNip se administró en PBS, por tanto el grupo de PBS sirve de control para reflejar la variabilidad en los niveles de hAAT en suero. La administración subcutánea de ARNip de AAT condujo a inhibición dependiente de la dosis de hAAT en suero, con inhibición máxima de >95 % observada a una dosis de 3 mg/kg. Una dosis única de 1 mg/kg mantuvo niveles del 40 % de hAAT durante al menos 15 días. También se administraron animales con AD-59054 a una dosis de 0,5 mg/kg dos veces a la semana (Figura 3C). La dosis de repetición conduce a una respuesta acumulada y superior al 90 % de supresión de proteína. Cada punto de datos es un promedio de cuatro animales y las barras de error reflejan la desviación estándar.

Ejemplo 5. Disminución de la incidencia de tumor con reducción en Z-AAT.

Ratones transgénicos que expresan Z-AAT humana desarrollan tumores con la edad. Este experimento se diseñó para determinar si la administración crónica de estos ratones envejecidos con un ARNip de la invención podía disminuir la incidencia de tumor en los ratones. Específicamente, ratones envejecidos (25-46 semanas de edad) con hígados fibróticos fueron crónicamente administrados con dúplex de ARNip AD-58681 para disminuir la incidencia de tumor de hígado. Los animales fueron administrados por vía subcutánea cada dos semanas (Q2W) con PBS o 10 mg/kg de ARNip de AAT durante 11 dosis y se sacrificaron 7 días después de la última dosis (Figura 4A). Se midieron los niveles en hígado de ARNm de hAAT, ARNm de Col1a2 y ARNm de PtPrc en grupos de control y tratados. Los animales tratados con ARNip de AAT mostraron más del 90 % de disminución en los niveles de ARNm de hAAT (Figura 4B). Se midió ARNm de Col1a2 como marcador de fibrosis y los niveles de este marcador disminuyeron en animales tratados con ARNip de AAT (Figura 4C). Se midió ARNm de PtPrc (CD45) como marcador para la presencia de células inmunitarias (Figura 4D). Hay más infiltración de células inmunitarias en hígados enfermos y, como se muestra en la Figura 4D, los niveles de ARNm de PtPrc disminuyeron significativamente cuando los animales se trataron con ARNip de AAT.

Se recogieron muestras de suero después de la primera dosis para monitorizar el grado de supresión de AAT. Todos los animales tratados con ARNip de AAT mostraron menos del 5 % de proteína AAT residual y una dosis única mantuvo los niveles de AAT por debajo del 80 % durante 14 días antes de administrar la siguiente dosis (Figura 5A). La Tabla 6 proporciona observaciones de los animales en el momento del sacrificio (día 132). Animales transgénicos administrados con el dúplex de ARNip presentaron incidencia tumoral reducida cuando se compararon con animales de control no tratados. Específicamente, cuatro de los seis animales tratados con PBS mostraron tumores en los hígados, mientras que solo uno de los seis animales tratados con ARNip de AAT mostró un tumor de hígado. Se calculó que el valor de p para la diferencia en la incidencia de tumor por la prueba de la t era 0,045. La Figura 5B y Figura 5C muestran tinción con PAS de secciones de hígado de dos compañeros de camada tratados con ya fuera PBS o ARNip de AAT. Los puntos de color más oscuro representan los glóbulos o agregados de Z-AAT. Estos datos indican que el dúplex de ARNip es eficaz en disminuir los niveles de Z-AAT en ratones transgénicos y los reducidos niveles de Z-AAT muestran un beneficio fisiológico en forma de hígados más sanos.

Tabla 6.

Tratamiento	Animal N.º	Observación
PBS	4734	hígado pálido
	4737	tumor grande en el lóbulo lateral izquierdo, ~5 mm de diámetro
	4754	hígado pálido, tumor de 2 mm en el lóbulo caudado, muchas lesiones en el 2º lóbulo auxiliar
	4759	hígado oscuro, tumor de 1,5 mm en el lóbulo caudado, lesión de 1 mm en el lóbulo medial derecho, múltiples lesiones de 1 mm en 1º lóbulo auxiliar
	4771	tumor de 3 mm en el lóbulo lateral izquierdo
	4775	hígado oscuro
AAT-ARNip	4748	hígado oscuro
	4756	hígado pálido, tumor de 3 mm en el lóbulo caudado
	4760	hígado oscuro
	4770	nada anormal
	4772	nada anormal
	4776	nada anormal

Ejemplo 6. Optimización de moléculas de partida de AD-59054

Como se ha descrito anteriormente, se demostró que AD-59054 suprimía duraderamente AAT de una manera sensible a la dosis *in vivo*. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de AD-59054 abarca una región en ARNm de AAT que incluye un polimorfismo prevalente de un solo nucleótido (SNP) (N.º de acceso de SNP de referencia: rs1303 (véase, por ejemplo, www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)). Específicamente, la localización de SNP se corresponde con el nucleótido en la posición 6 (5' a 3') en la hebra no codificante de AD-59054 (es decir, dentro de la región semilla de AD-59054). Por consiguiente, como desapareamientos dentro de la región semilla pueden conducir

a efectos inespecíficos y/o pérdida de eficacia, se prepararon dúplex adicionales que tenían diversas bases en la posición 6 (5' a 3') de la hebra no codificante basándose en la secuencia de AD-59054. El ARNm diana lleva una A correspondiente a la posición 6 (5' a 3') de la hebra no codificante de AD-59054. Las secuencias de estos dúplex se proporcionan en la Tabla 7. La Tabla 8 proporciona las secuencias de estos mismos dúplex que tienen diversas modificaciones químicas y conjugados con un GalNAc trivalente.

Se evaluaron estos dúplex modificados para eficacia en un cribado por captación libre de dosis única en hepatocitos primarios de ratón (Hep3B), como se ha descrito anteriormente. ARNm de células Hep3B lleva una C en la posición correspondiente a la posición 6 (5' a 3') de la hebra no codificante de AD-59054. Los valores de CI_{50} para los dúplex se muestran en la Tabla 8. Sorprendentemente, como se demuestra allí, se toleró un único desapareamiento dentro de la región semilla en la posición 6 para todas las bases, excepto C.

También se evaluó un subconjunto de estos dúplex para eficacia *in vivo*. Se inyectaron ratones transgénicos que expresaban el alelo Z-AAT humana (y que tiene una A en el ARNm correspondiente a la posición 6 (5' a 3') de la hebra no codificante de AD-59054) con 1,0 mg/kg de AD-59054, AD-61719, AD-61700, AD-61726 o AD-61704 en el día 0 y la AAT humana de suero, medida como se ha descrito anteriormente, fue seguida durante 14 días después de la dosis (Figura 6). Cada punto representa un promedio de tres ratones y las barras de error reflejan la desviación estándar. Como se demuestra en la figura 6, AD-61719 y AD-61704 cumplen, además de AD-59054 parental.

Tabla 7.

Nombre de dúplex	Sentido (5' -> 3')	SEQ ID NO:	Antisentido (5' -> 3')	SEQ ID NO:
AD-59054	CUUCUAAUGAUUGAACAAAA	401	UUUUGUCAAUCAUUAAGAAGAC	409
AD-61704	CUUCUAAUGAUUGACCAAAA	402	UUUUGGUCAAUCAUUAAGAAGAC	410
AD-61708	CUUCUAAUGAUUGAUCAAAA	403	UUUUGAUCAAUCAUUAAGAAGAC	411
AD-61712	CUUCUAAUGAUUGAGCAAAA	404	UUUUGCUCAAUCAUUAAGAAGAC	412
AD-61719	CUUCUAAUGAUUGACCAAAA	405	UUUUGIUCAAUCAUUAAGAAGAC	413
AD-61700	CUUCUAAUGAUUGACCAAAA	406	UUUUGNUCAAUCAUUAAGAAGAC	414
AD-61726	CUUCUAAUGAUUGAACAAAA	407	UUUUGNUCAAUCAUUAAGAAGAC	415
AD-61716	CUUCUAAUGAUUGAACAAAA	408	UUUUGNUCAAUCAUUAAGAAGAC	416

Ejemplo 7. Optimización de moléculas de partida de AD-59054

Se prepararon dúplex adicionales basados en la secuencia de AD-59054, que incluye AD-61444. Se proporcionan las secuencias sentido y antisentido modificadas y sin modificar de AD-61444 en la Tabla 9.

Tabla 9.

Nombre de dúplex	Sentido sin modificar (5' -> 3')	Antisentido sin modificar (5' -> 3')
AD-61444	CUUCUAAUGAUUGAACAAAA (SEQ ID NO: 417)	UUUUGUCAAUCAUUAAGAAGAC (SEQ ID NO: 419)
	Sentido modificado (5' -> 3')	Antisentido modificado (5' -> 3')
	csusucuuaauGfAfuugaacaaaaL96 (SEQ ID NO: 418)	usUfsuUfgUfuCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc (SEQ ID NO: 420)

Tabla 8.

Nombre de dúplex	Base en la posición 6	Sentido (5' -> 3')	SEQ ID NO:	Antisentido (5' -> 3')	SEQ ID NO:	CI50
						media
AD-59054	U (compuesto parental)	CfsusUfcUfuAfaUfGfAfuUfgAfaCfaAfaAflL96	421	usUfsuUfgUfuCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc	429	0,098
AD-61704	G	CfsusUfcUfuAfaUfGfAfuUfgAfcCfaAfaAflL96	422	usUfsuUfgGfuCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc	430	0,102
AD-61708	A	CfsusUfcUfuAfaUfGfAfuUfgAfuCfaAfaAflL96	423	usUfsuUfgAfuCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc	431	0,147
AD-61712	C	CfsusUfcUfuAfaUfGfAfuUfgAfgCfaAfaAflL96	424	usUfsuUfgCfuCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc	432	1,499
AD-61719	I (inosina)	CfsusUfcUfuAfaUfGfAfuUfgAfcCfaAfaAflL96	425	usUfsuUfgiuCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc	433	0,088
AD-61700	dl (desoxiinosina) (S/AS ¹ : C/dl)	CfsusUfcUfuAfaUfGfAfuUfgAfcCfaAfaAflL96	426	usUfsuUfgdluCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc	434	0,097
AD-61726	dl (desoxiinosina) (S/AS: A/dl)	CfsusUfcUfuAfaUfGfAfuUfgAfaCfaAfaAflL96	427	usUfsuUfgdluCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc	435	0,059
AD-61716	2'-OMe abásico	CfsusUfcUfuAfaUfGfAfuUfgAfaCfaAfaAflL96	428	usUfsuUfgY34uCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc	436	0,333

¹ S/AS: Sentido/Antisentido.

Ejemplo 8. Administración de primate no humano con AD-59054, AD-61719 y AD-61444

Se probaron AD-59054, AD-61719 y AD-61444 para eficacia en primates no humanos administrando a los primates una dosis única de 1 mg/kg o 3 mg/kg de AD-59054, AD-61719 o AD-61444. Se recogieron muestras de suero cinco días antes de la administración, en el día 0, y en los días 3, 7, 10, 15, 20 y 30 después de la administración para monitorizar el grado de supresión de AAT midiendo los niveles de proteína hAAT en suero usando ELISA específico de AAT humana. No hubo cambios en los niveles de citocinas o quimiocinas en el suero de los animales administrados con cualquiera de los compuestos, y ninguna reacción del sitio de inyección o problemas de salud relacionados con el fármaco se asociaron a la administración de los compuestos. La Figura 7 muestra que una dosis única de 1 mg/kg de AD-59054, AD-61719 o AD-61444 (7A) o una dosis única de 3 mg/kg de AD-59054, AD-61719 o AD-61444 (7B) produce una reducción dependiente de la dosis y duradera de la proteína AAT.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.

<120> COMPOSICIONES DE ARNi DE SERPINA1 Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS

<130> 121301-00620

<140> NUEVA SOLICITUD

<141> SIMULTÁNEAMENTE CON LA PRESENTE

<150> 61/989.028

<151> 06-05-2014

<150> 61/979.727

<151> 15-04-2014

<150> 61/898.695

<151> 01-11-2013

<150> 61/826.125

<151> 22-05-2013

<160> 436

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 3220

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

acaatgactc ctttcggtaa gtgcagtgga agctgtacac tgcccaggca aagcgtccgg	60
gcagcgtagg cgggcgactc agatcccagc cagtggactt agcccctggt tgctcctccg	120
ataactgggg tgaccttggg taatattcac cagcagcctc ccccgttgcc cctctggatc	180
cactgcttaa atacggacga ggacagggcc ctgtctcctc agcttcaggc accaccactg	240
acctgggaca gtgaatcgac aatgccgtct tctgtctcgt ggggcatcct cctgctggca	300
ggcctgtgct gcctgggtccc tgtctccctg gctgaggatc ccaggggaga tgctgccag	360
aagacagata catcccacca tgatcaggat caccacacct tcaacaagat caccaccaac	420
ctggctgagt tcgccttcag cctataccgc cagctggcac accagtccaa cagcaccaat	480
atcttcttct cccagtgag catcgctaca gcctttgcaa tgctctccct ggggaccaag	540
gctgacactc acgatgaaat cctggagggc ctgaatttca acctcacgga gattccggag	600
gctcagatcc atgaaggctt ccagggaactc ctccgtaccc tcaaccagcc agacagccag	660
ctccagctga ccaccggcaa tggcctgttc ctcagcgagg gcctgaagct agtggataag	720
tttttgagg atgttaaaaa gttgtaccac tcagaagcct tcaactgtcaa cttcggggac	780
accgaagagg ccaagaaaca gatcaacgat tacgtggaga agggactca agggaaaatt	840
gtggatttgg tcaaggagct tgacagagac acagtttttg ctctggtgaa ttacatcttc	900

ES 2 676 146 T3

tttaaaggca aatgggagag accctttgaa gtcaaggaca ccgaggaaga ggacttccac	960
gtggaccagg tgaccacogt gaaggtgoot atgatgaagc gtttaggcat gtttaacatc	1020
cagcactgta agaagctgtc cagctgggtg ctgctgatga aatacctggg caatgccacc	1080
gccatcttct tctgctga tgaggggaaa ctacagcacc tggaaaatga actcaccac	1140
gatatcatca ccaagttcct ggaaaatgaa gacagaaggt ctgccagctt acatttacc	1200
aaactgtcca ttactggaac ctatgatctg aagagcgtcc tgggtcaact gggcatcact	1260
aaggtcttca gcaatggggc tgacctctcc ggggtcacag aggaggcacc cctgaagctc	1320
tccaaggccg tgcataaggc tgtgtgacc atcgacgaga aagggaactga agctgctggg	1380
gccatgtttt tagaggccat acccatgtct atccccccg aggtcaagtt caacaaaccc	1440
tttgtcttct taatgattga aaaaaatacc aagtctcccc tcttcatggg aaaagtggg	1500
aatccccccc aaaaataact gcctctcgct cctcaacccc tccccctcat cctggcccc	1560
ctccctggat gacattaaag aagggttgag ctggtccctg cctgcatgtg actgtaaatac	1620
cctcccatgt tttctctgag tctcccttg cctgctgagg ctgtatgtgg gctccaggta	1680
acagtgtgtt ctccggggcc cctgaactgt gttcatggag catctggctg ggtaggcaca	1740
tgtctgggctt gaatccaggg gggactgaat cctcagctta cggacctggg cccatctgtt	1800
tctggagggc tccagtcttc cttgtcctgt cttggagtcc ccaagaagga atcacagggg	1860
aggaaccaga taccagccat gacccaggc tccaccaagc atcttcatgt cccctgctc	1920
atccccact cccccccacc cagagttgct catcctgcca gggctggctg tgccccccc	1980
aaggctgccc tctggggggc cccagaactg cctgatcgtg ccgtggccca gttttgtggc	2040
atctgcagca acacaagaga gaggacaatg tctctctctt gacctgctgt cacttaacca	2100
gactcggggc ctgcacctct caggcacttc tggaaaatga ctgaggcaga ttcttctga	2160
agccattctt ccatggggca acaaggacac ctattctgtc cttgtccttc catcgtgccc	2220
ccagaaaagc tcacatatct ccgttttagaa tcaggctcct tctccccaga tgaagaggag	2280
ggtctctgct ttgttttctc tatctcctcc tcagacttga ccaggcccag caggccccag	2340
aagaccatta ccctatatcc cttctcctcc ctagtccat gcccataggc ctgctgatgg	2400
ctcaggaagg ccattgcaag gactcctcag ctatgggaga ggaagccat caccattga	2460
cccccgcaac ccctcccttt cctcctctga gtcccagctg gggccacatg cagcctgact	2520
tctttgtgcc tgttctgtgc cctgcagtct tcagagggcc accgcagctc cagtgccacg	2580
gcaggaggct gtctctgaat agccctgtg gtaaggggca ggagagtcct tccatcctcc	2640
aaggccctgc taaaggacac agcagccagg aagtcctctg gggccctagc tgaaggacag	2700
cctgctcctt ccgtctctac caggaaatggc cttgtcctat ggaaggcact gccccatccc	2760
aaactaatct aggaatcact gtctaaccac tcactgtcat gaatgtgtac ttaaaggatg	2820

ES 2 676 146 T3

aggttgagtc ataccaaata gtgatttcga tagttcaaaa tggatgaaatt agcaattcta	2880
catgattcag tctaataaat ggataccgac tgtttccac acaagtctcc tgttctctta	2940
agcttactca ctgacagcct ttactctcc acaatacat taaagatatg gccatcacca	3000
agccccctag gatgacacca gacctgagag tctgaagacc tggatccaag ttctgacttt	3060
tccccctgac agctgtgtga ccttcgtgaa gtcgccaaac ctctctgagc cccagtcatt	3120
gctagtaaga cctgcctttg agttggatg atgttcaagt tagataacaa aatgtttata	3180
cccattagaa cagagaataa atagaactac atttcttgca	3220

<210> 2

<211> 3199

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga	60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggagagg ctagccgctg	120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc	180
tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaaggaca	240
atgccgtcct ctgtctcgtg gggcatcctc ctgctggcag gcctgtgctg cctggtccct	300
gtctccctgg ctgaggatcc ccaggagagat gctgccaga agacagatac atcccaccat	360
gatcaggatc acccaacctt caacaagatc accccaacc tggctgagtt cgccttcagc	420
ctataccgcc agctggcaca ccagtccaac agcaccaata tcttcttctc cccagtgagc	480
atcgctacag cctttgcaat gctctccctg gggaccaagg ctgacactca cgatgaaatc	540
ctggagggcc tgaatttcaa cctcacggag attccggagg ctcatatcca tgaaggcttc	600
caggaactcc tccgtaccct caaccagcca gacagccagc tccagctgac caccggcaat	660
ggcctgttcc tcagcgaggg cctgaagcta gtggataagt ttttgaggga tgttaaaaag	720
ttgtaccact cagaagcctt cactgtcaac ttcggggaca ccgaagaggc caagaaacag	780
atcaacgatt acgtggagaa gggactcaa gggaaaattg tggatttggt caaggagctt	840
gacagagaca cagtttttgc tctggtgaat tacatcttct ttaaaggcaa atgggagaga	900
ccctttgaag tcaaggacac cgaggaagag gacttccacg tggaccaggc gaccaccgtg	960
aaggtgccta tgatgaagcg tttaggcatg tttaacatcc agcactgtaa gaagctgtcc	1020
agctgggtgc tgctgatgaa atacctgggc aatgccaccg ccattcttct cctgcctgat	1080
gaggggaaac tacagcacct ggaaaatgaa ctcaccacag atatcatcac caagttcctg	1140
gaaaatgaag acagaaggtc tgccagctta catttaccca aactgtccat tactggaacc	1200
tatgatctga agagcgtcct gggcgaactg ggcactacta aggtcttcag caatggggct	1260

10

ES 2 676 146 T3

gacctctccg gggtcacaga ggaggcacc	ctgaagctct ccaaggccgt gcataaggct	1320
gtgctgacca tcgacgagaa agggactgaa	gctgctgggg ccatgttttt agaggccata	1380
cccatgtcta tccccccga ggtcaagttc	aacaaacctt ttgtcttctt aatgattgaa	1440
caaaatacca agtctccctt ctcatggga	aaagtgggta atcccacca aaaataactg	1500
cctctcgctc ctcaaccctt cccctccatc	cctggccccc tccctggatg acattaaaga	1560
agggttgagc tggtcctgc ctgcatgtga	ctgtaaattc ctcccatgtt ttctctgagt	1620
ctccctttgc ctgctgaggc tgtatgtggg	ctccaggtaa cagtgtgtgc ttggggcccc	1680
ctgaactgtg ttcatggagc atctggctgg	gtaggacat gctgggcttg aatccagggg	1740
ggactgaatc ctgagcttac ggacctgggc	ccatctgttt ctggagggtt ccagtcttcc	1800
ttgtcctgtc ttggagtcct caagaaggaa	tcacagggga ggaaccagat accagccatg	1860
accccaggct ccaccaagca tcttcatgtc	ccctgtctca tccccactc cccccaccc	1920
agagttgtct atcctgccag ggctggctgt	gcccacccca aggctgcctt cctggggggc	1980
ccagaactgc ctgacgtgc cgtggcccag	ttttgtggca tctgcagcaa cacaagagag	2040
aggacaatgt cctcctcttg acccgctgtc	acctaaccag actcggggcc tgcacctctc	2100
aggcacttct ggaaaatgac tgaggcagat	tcttcctgaa gccattctc catggggcaa	2160
caaggacacc tattctgtcc ttgtccttcc	atcgtgtccc cagaaagcct cacatatctc	2220
cgtttagaat caggtccctt ctcccagat	gaagaggagg gtctctgtt tgttttctct	2280
atctcctcct cagacttgac caggcccagc	aggccccaga agaccattac cctatatccc	2340
ttctcctccc tagtcacatg gccataggcc	tgtctatggc tcaggaaggc cattgcaagg	2400
actcctcagc tatgggagag gaagcacatc	acctattgac ccccgcaacc cctccctttc	2460
ctcctctgag tcccgactgg ggccacatgc	agcctgactt ctttgtgctt gttgtgtcc	2520
ctgcagtctt cagagggccca ccgcagctcc	agtgccacgg caggaggctg ttctgaata	2580
gcccctgtgg taaggggccag gagagtcctt	ccatcctcca aggccctgct aaaggacaca	2640
gcagccagga agtcccctgg gccctagct	gaaggacagc ctgctccctc cgtctctacc	2700
aggaatggcc ttgtcctatg gaaggcactg	ccccatccca aactaatcta ggaatcactg	2760
tctaaccact cactgtcatg aatgtgtact	taaaggatga gggttgagtca taccaaatag	2820
tgatttcgat agttcaaaat ggtgaaatta	gcaattctac atgattcagt ctaatcaatg	2880
gataaccgact gtttccaca caagtctcct	gttctcttaa gcttactcac tgacagcctt	2940
tcactctcca caaatacatt aaagatatgg	ccatcaccaa gcccctagg atgacaccag	3000
acctgagagt ctgaagacct ggatccaagt	tctgactttt ccccctgaca gctgtgtgac	3060
cttcgtgaag tcgccaaacc tctctgagcc	ccagtcattg ctagtaagac ctgcctttga	3120
gttggtatga tgttcaagtt agataacaaa	atgtttatac ccattagaac agagaataaa	3180
tagaactaca tttcttgca		3199

5 <210> 3

<211> 3513

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

5

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga	60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg	120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt cagggcactc	180
tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggcg	240
gcagtaagtc ttcagcatca ggcatttttg ggtgactcag taaatggtag atcttgctac	300
cagtggaaaca gccactaagg attctgcagt gagagcagag ggccagctaa gtggtactct	360
cccagagact gtctgactca cgccaccccc tccaccttgg acacaggacg ctgtggtttc	420
tgagccaggt acaatgactc ctttcgcagc ctccccctgt gccctctgg atccactgct	480
taaatacggg cgaggacagg gccctgtctc ctacgcttca ggcaccacca ctgacctggg	540
acagtgaatc gacaatgccg tcttctgtct cgtggggcat cctcctgctg gcaggcctgt	600
gctgcctggt ccctgtctcc ctggctgagg atccccaggg agatgctgcc cagaagacag	660
atacatccca ccatgatcag gatcacccaa ccttcaacaa gatcaccccc aacctggctg	720
agttcgcctt cagcctatac cgccagctgg cacaccagtc caacagcacc aatatcttct	780
tctccccagt gagcatcgtc acagcctttg caatgctctc cctggggacc aaggctgaca	840
ctcacgatga aatcctggag ggcctgaatt tcaacctcac ggagattccg gaggtcaga	900
tccatgaagg cttccaggaa ctctccgta ccctcaacca gccagacagc cagctccagc	960
tgaccaccgg caatggcctg ttctcagcg agggcctgaa gctagtggat aagtttttg	1020
aggatgttaa aaagttgtac cactcagaag ccttcaactgt caacttcggg gacaccgaag	1080
aggccaagaa acagatcaac gattacgtgg agaagggtac tcaagggaaa attgtggatt	1140
tggtcaagga gcttgacaga gacacagttt ttgctctggg gaattacatc ttctttaag	1200
gcaaattggga gagacccttt gaagtcaagg acaccgagga agaggacttc cacgtggacc	1260
aggtgaccac cgtgaagggt cctatgatga agcgtttagg catgtttaac atccagcact	1320
gtaagaagct gtccagctgg gtgctgctga tgaaatacct gggcaatgcc accgccatct	1380
tcttcctgcc tgatgagggg aaactacagc acctggaaaa tgaactcacc cacgatatca	1440
tcaccaagtt cctggaaaat gaagacagaa ggtctgccag cttacattta cccaaactgt	1500
ccattactgg aacctatgat ctgaagagcg tcctgggtca actgggcac c actaaggctct	1560

ES 2 676 146 T3

tcagcaatgg ggetgacctc tccggggtca cagaggaggc acccctgaag ctctccaagg	1620
ccgtgcataa ggctgtgctg accatcgacg agaaagggac tgaagctgct ggggccatgt	1680
tttttagaggc catacccatg tctatccccc ccgagggtcaa gttcaacaaa ccccttgtct	1740
tcttaatgat tgaacaaaat accaagtctc cctctctcat gggaaaagtg gtgaatccca	1800
cccaaaaata actgcctctc gctcctcaac cctccccc cctccctggc cccctccctg	1860
gatgacatta aagaagggtt gagctgggtc ctgcctgcat gtgactgtaa atccctccca	1920
tgttttctct gagtctccct ttgcctgctg aggtctgtatg tgggctccag gtaacagtgc	1980
tgtcttcggg cccctgaac tgtgttcatt gagcatctgg ctgggtaggc acatgctggg	2040
cttgaatcca ggggggactg aatcctcagc ttacggacct gggcccatct gtttctggag	2100
ggctccagtc ttccttgtcc tgtcttgag tccccaagaa ggaatcacag gggaggaacc	2160
agataccagc catgaccca ggctccacca agcatcttca tgtccccc ctcaccccc	2220
actccccccc acccagagtt gctcatcctg ccagggtctg ctgtgccac cccaaggctg	2280
ccctcctggg ggcccagaa ctgcctgac gtgcctggc ccagttttgt ggcatctgca	2340
gcaacacaag agagaggaca atgtcctcct cttgaccgc tgtcacctaa ccagactcgg	2400
gcctgcacc tctcaggcac ttctggaaaa tgactgaggc agattcttcc tgaagcccat	2460
tctccatggg gcaacaagga cacctattct gtcttgtcc ttccatcgt gcccagaaa	2520
gcctcacata tctcgttta gaatcaggtc ccttctccc agatgaagag gagggctctct	2580
gctttgttt ctctatctcc tctcagact tgaccaggcc cagcaggccc cagaagacca	2640
ttaccctata tccctctcc tccctagtca catggccata ggctgctga tggctcagga	2700
aggccattgc aaggactcct cagctatggg agaggaagca catcaccat tgacccccgc	2760
aaccctccc tttcctctc tgagtccga ctggggccac atgcagcctg acttctttgt	2820
gcctgttct gtccctgcag tcttcagagg gccaccgcag ctccagtgc accgcaggag	2880
gctgttctg aatagccct gtggaaggc ccaggagagt ccttccatcc tccaaggccc	2940
tgctaaagga cacagcagcc aggaagtccc ctggggccct agctgaagga cagcctgctc	3000
cctccgtctc taccaggaat ggccttgtcc tatggaaggc actgcccac cccaaactaa	3060
tctaggaatc actgtctaac cactcactgt catgaatgtg tacttaaagg atgaggttga	3120
gtcataccaa atagtattt cgatagttca aaatggtgaa attagcaatt ctacatgatt	3180
cagtctaac aatggatacc gactgtttcc cacacaagtc tctgttctc ttaagcttac	3240
tactgacag ctttctactc tccacaaata cattaaagat atggccatca ccaagcccc	3300
taggatgaca ccagacctga gagtctgaag acctggatcc aagttctgac ttttccccct	3360
gacagctgtg tgaccttctg gaagtcgcca aacctctctg agccccagtc attgctagta	3420
agacctgcct ttgagttggt atgatgttca agttagataa caaatgttt ataccatta	3480
 gaacagagaa taaatagaac tacatttctt gca	 3513

5
<210> 4
<211> 3236
<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga	60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg	120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc	180
tctctgtcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggtg	240
gacattgctg ctgctgtctc ctcagttcca caggacaatg ccgtcttctg tctcgtgggg	300
cactctcctg ctggcaggcc tgtgtgcctt ggtccctgtc tccctggctg aggatcccca	360
gggagatgct gccagaaga cagatacatc ccaccatgat caggatcacc caaccttcaa	420
caagatcacc cccaacctgg ctgagttcgc cttcagccta taccgccagc tggcacacca	480
gtccaacagc accaatatct tcttctcccc agtgagcatc gctacagcct ttgcaatgct	540
ctccctgggg accaaggctg acactcacga tgaaatcctg gagggcctga atttcaacct	600
cacggagatt ccggaggctc agatccatga aggcttccag gaactcctcc gtaccctcaa	660
ccagccagac agccagctcc agctgaccac cggcaatggc ctgttcctca gcgagggcct	720
gaagctagtg gataagtttt tggaggatgt taaaaagttg taccactcag aagccttcac	780
tgtcaacttc ggggacaccg aagaggccaa gaaacagatc aacgattacg tggagaaggg	840
tactcaaggg aaaattgtgg atttggtcaa ggagcttgac agagacacag tttttgctct	900
ggtgaattac atcttcttta aaggcaaatg ggagagaccc tttgaagtca aggacaccga	960
ggaagaggac ttccacgtgg accaggtgac caccgtgaag gtgcctatga tgaagcgttt	1020
aggcatgttt aacatccagc actgtaagaa gctgtccagc tgggtgctgc tgatgaaata	1080
cctgggcaat gccaccgcca tcttcttcct gcctgatgag gggaaactac agcacctgga	1140
aatgaactc acccacgata tcatcaccaa gttcctggaa aatgaagaca gaaggtctgc	1200
cagcttacat ttacccaaac tgtccattac tggaaacctat gatctgaaga gcgtcctggg	1260
tcaactgggc atcactaagg tcttcagcaa tggggctgac ctctccgggg tcacagagga	1320
ggcaccctg aagctctcca aggccgtgca taaggctgtg ctgaccatcg acgagaaagg	1380
gactgaagct gctggggcca tgtttttaga ggccataccc atgtctatcc ccccgaggt	1440
caagttcaac aaacctttg tcttcttaat gattgaacaa aataccaagt ctccccctct	1500
catgggaaaa gtggtgaatc ccacccaaaa ataactgcct ctcgctcctc aacctctccc	1560
ctccatccct ggccccctcc ctggatgaca ttaaagaagg gttgagctgg tccctgcctg	1620

ES 2 676 146 T3

catgtgactg taaatccctc ccatgttttc tctgagtctc cctttgcctg ctgaggctgt 1680
atgtgggctc caggtaacag tgctgtcttc gggccccctg aactgtgttc atggagcatc 1740
tggtctgggta ggcacatgct gggcttgaat ccagggggga ctgaatcctc agcttacgga 1800
cctgggcccc tctgtttctg gagggctcca gtcttccttg tctgtcttg gaggcccaa 1860
gaaggaatca caggggagga accagatacc agccatgacc ccaggctcca ccaagcatct 1920
tcatgtcccc ctgctcatcc cccactcccc cccaccaga gttgctcatc ctgccagggc 1980
tggtctgtgcc caccacaagg ctgccctcct gggggccccca gaactgcctg atcgtgccgt 2040
ggcccagttt tgtggcatct gcagcaacac aagagagagg acaatgtcct cctcttgacc 2100
cgctgtcacc taaccagact cgggccctgc acctctcagg cacttctgga aaatgactga 2160
ggcagattct tctgaagcc cattctccat ggggcaacaa ggacacctat tctgtccttg 2220
tccttcctac gctgccccag aaagcctcac atatctcctg ttagaatcag gtcccttctc 2280
cccagatgaa gaggaggggc tctgctttgt tttctctatc tctcctcag acttgaccag 2340
gccagcagg cccagaaga ccattaccct atatcccttc tctcctcag tcacatggcc 2400
ataggcctgc tgatggctca ggaaggccat tgcaaggact cctcagctat gggagaggaa 2460
gcacatcacc cattgacccc cgcaaccctt ccctttcctc ctctgagtcg cgactggggc 2520
cacatgcagc ctgacttctt tgtgcctgtt gctgtccctg cagtcttcag agggccaccg 2580
cagctccagt gccacggcag gaggtgttc ctgaatagcc cctgtggtaa gggccaggag 2640
agtccttcca tctccaagg ccctgctaaa ggacacagca gccaggaagt cccctgggcc 2700
cctagctgaa ggacagcctg ctccctcctg ctctaccagg aatggccttg tcctatggaa 2760
ggcactgccc catcccaaac taatctagga atcactgtct aaccactcac tgtcatgaat 2820
gtgtacttaa aggatgaggt tgagtcatc caaatagtga tttcgatagt tcaaatggt 2880
gaaattagca attctacatg attcagtcta atcaatggat accgactgtt tcccacacaa 2940
gtctcctgtt ctcttaagct tactcactga cagccttca ctctcccaa atacattaaa 3000
gatatggcca tcaccaagcc ccctaggatg acaccagacc tgagagtctg aagacctgga 3060
tccaagttct gacttttccc cctgacagct gtgtgacctt cgtgaagtcg ccaaacctct 3120
ctgagcccca gtcattgcta gtaagacctg cctttgagtt ggtatgatgt tcaagttaga 3180
taacaaaatg tttataccca ttagaacaga gaataaatag aactacattt cttgca 3236

<210> 5

<211> 3532

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

10

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aacctcaga 60

ES 2 676 146 T3

gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg	120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc	180
tccctgtgct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggtg	240
gacattgctg ctgctgctca ctcagttcca cagggcggca gtaagtcttc agcatcaggc	300
atcttggggt gactcagtaa atggtagatc ttgctaccag tggaacagcc actaaggatt	360
ctgcagttag agcagagggc cagctaagtg gtactctccc agagactgtc tgactcacgc	420
cacccctccc accttgagca caggacgctg tggtttctga gccagcagcc tccccggtg	480
ccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggg ccctgtctcc tcagcttcag	540
gcaccaccac tgacctgga cagtgaatcg acaatgccgt cttctgtctc gtggggcatc	600
ctcctgctgg caggcctgtg ctgcctggtc cctgtctccc tggtctagga tccccagga	660
gatgctgccc agaagacaga tacatccac catgatcagg atcaccacac cttcaacaag	720
atcaccccca acctggctga gttgccttc agcctatacc gccagctggc acaccagtcc	780
aacagcacca atatcttctt ctcccagtg agcatcgcta cagcctttgc aatgctctcc	840
ctggggacca aggctgacac tcacgatgaa atcctggagg gcctgaattt caacctcacg	900
gagattccgg aggctcagat ccatgaaggc ttccaggaac tcctccgtac cctcaaccag	960
ccagacagcc agctccagct gaccaccggc aatggcctgt tcctcagcga gggcctgaag	1020
ctagtggata agtttttggg ggatgttaaa aagtgtgacc actcagaagc cttcactgtc	1080
aacttcgggg acaccgaaga ggccaagaaa cagatcaacg attacgtgga gaagggtact	1140
caagggaaaa ttgtggattt ggtcaaggag cttgacagag acacagtttt tgctctggtg	1200
aattacatct tctttaagg caaatgggag agaccctttg aagtcaagga caccgaggaa	1260
gaggacttcc acgtggacca ggtgaccacc gtgaagggtc ctatgatgaa gcgtttaggc	1320
atgtttaaca tccagcactg taagaagctg tccagctggg tgctgctgat gaaatacctg	1380
ggcaatgcca ccgccatctt cttcctgcct gatgagggga aactacagca cctggaaaat	1440
gaactcacc acgatatcat caccaagttc ctggaaaatg aagacagaag gtctgccagc	1500
ttacatttac ccaaactgtc cttactgga acctatgatc tgaagagcgt cctgggtcaa	1560
ctgggcatca ctaaggctt cagcaatggg gctgacctc ccgggggtcac agaggaggca	1620
cccctgaagc tctccaaggc cgtgcataag gctgtgctga ccatcgacga gaaagggact	1680
gaagctgctg gggccatgtt tttagaggcc ataccatgt ctatcccccc cgaggtcaag	1740
ttcaacaaac ctttgtctt cttaatgatt gaacaaaata ccaagtctcc cctcttcctg	1800
ggaaaagtgg tgaatccac ccaaaaataa ctgcctctcg ctctcaacc cctccctcc	1860
atccctggcc ccctccctgg atgacattaa agaagggttg agctggtccc tgctgcatg	1920

ES 2 676 146 T3

tgactgtaaa tccctcccat gttttctctg agtctccctt tgccctgctga ggctgtatgt 1980
 gggctccagg taacagtgtt gtcttcgggc cccctgaact gtgttcattg agcatctggc 2040
 tgggtaggca catgctgggc ttgaatccag gggggactga atcctcagct tacggacctg 2100
 ggcccatctg tttctggagg gctccagtct tccttgctct gtcttgaggc cccaagaag 2160
 gaatcacagg ggaggaacca gataccagcc atgaccccag gctccaccaa gcatcttcat 2220
 gtccccctgc tcatccccc cccccccca cccagagttg ctcatcctgc cagggtgggc 2280
 tgtgccacc ccaaggctgc cctcctgggg gcccagaaac tgccctgatg tgccgtgggc 2340
 cagttttctg gcatctgcag caacacaaga gagaggacaa tgcctcctc ttgacctct 2400
 gtcacctaac cagactcggg cctgcacct ctcaggcact tctggaaaat gactgaggca 2460
 gattcttctt gaagccatt ctccatgggg caacaaggac acctattctg tccttgctct 2520
 tccatcgctg cccagaaaag ctcacatat ctccgtttag aatcaggctc cttctccca 2580
 gatgaagagg agggctctctg ctttgttttc tctatctcct cctcagactt gaccaggccc 2640
 agcaggcccc agaagaccat taccctatat ccttctcct cctagtac atggccatag 2700
 gcctgctgat ggctcaggaa ggccattgca aggactcctc agctatggga gaggaagcac 2760
 atcaccatt gacccccgca acccctcct ttcctcctc gagtcccgac tggggccaca 2820
 tgcagcctga cttctttgtg cctgttgctg tccctgcagt cttcagaggg ccaccgcagc 2880
 tccagtgcc cggcaggagg ctgttctga atagcccctg tggtaagggc caggagagtc 2940
 cttccatcct ccaaggccct gctaaaggac acagcagcca ggaagtccc tgggccccta 3000
 gctgaaggac agcctgctcc ctccgtctct accaggaatg gccttgctct atggaaggca 3060
 ctgccccatc ccaactaat ctaggaatca ctgtctaacc actcactgtc atgaatgtgt 3120
 acttaaagga tgaggttgag tcatacaaa tagtgatttc gatagttcaa aatggtgaaa 3180
 ttagcaattc tacatgattc agtctaata atggataccg actgtttccc acacaagtct 3240
 cctgttctct taagcttact cactgacagc ctttactct ccacaaatac attaaagata 3300
 tggccatcac caagccccct aggatgacac cagacctgag agtctgaaga cctggatcca 3360
 agttctgact tttccccctg acagctgtgt gacctctgtg aagtcgcaa acctctctga 3420
 gcccagtc ttgctagtaa gacctgcctt tgagttggta tgatgttcaa gttagataac 3480
 aaaatgttta taccattag aacagagaat aaatagaact acatttcttg ca 3532

<210> 6

<211> 3340

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

10 tgggcaggaa ctgggcactg tgccagggc atgcactgcc tccacgcagc aacctcaga 60

ES 2 676 146 T3

gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg	120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc	180
tccgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggtg	240
gacattgctg ctgctgctca ctcagttcca cagcagcctc ccccgttgcc cctctggatc	300
cactgcttaa atacggacga ggacagggcc ctgtctcctc agcttcaggc accaccactg	360
acctgggaca gtgaatcgac aatgccgtct tctgtctcgt ggggcacccct cctgctggca	420
ggcctgtgct gcctgggtccc tgtctccctg gctgaggatc cccagggaga tgctgccag	480
aagacagata catcccacca tgatcaggat caccacaacct tcaacaagat ccccccaac	540
ctggctgagt tcgccttcag cctataccgc cagctggcac accagtccaa cagcaccaat	600
atcttcttct cccagtgag catcgctaca gcctttgcaa tgctctccct ggggaccaag	660
gctgacactc acgatgaaat cctggagggc ctgaatttca acctcacgga gattccggag	720
gctcagatcc atgaaggctt ccaggaactc ctccgtacct tcaaccagcc agacagccag	780
ctccagctga ccaccggcaa tggcctgttc ctacagcagg gcctgaagct agtgagataag	840
tttttgagg atgttaaaaa gttgtaccac tcagaagcct tcaactgtca cttcggggac	900
accgaagagg ccaagaaaaca gatcaacgat tacgtggaga aggttactca agggaaaatt	960
gtggatttgg tcaaggagct tgacagagac acagtttttg ctctggtgaa ttacatcttc	1020
tttaaaggca aatgggagag accctttgaa gtcaaggaca ccgaggaaga ggacttccac	1080
gtggaccagg tgaccaccgt gaagggtgct atgatgaagc gtttaggcat gtttaacatc	1140
cagcactgta agaagctgtc cagctgggtg ctgctgatga aatacctggg caatgccacc	1200
gccatcttct tcctgcctga tgaggggaaa ctacagcacc tggaaaatga actcaccac	1260
gatatcatca ccaagttcct ggaaaatgaa gacagaaggt ctgccagctt acatttacct	1320
aaactgtcca ttactggaac ctatgatctg aagagcgtcc tgggtcaact gggcatcact	1380
aaggctctca gcaatggggc tgacctctcc ggggtcacag aggaggcacc cctgaagctc	1440
tccaaggccg tgcataaggc tgtctgacc atcgacgaga aagggaactga agctgctggg	1500
gccatgtttt tagaggccat acccatgtct atccccccg aggtcaagtt caacaaaccc	1560
tttgtcttct taatgattga acaaaatacc aagtctccc tcttcatggg aaaagtgggtg	1620
aatccacccc aaaaataact gcctctcgt cctcaacccc tccctccat ccctggcccc	1680
ctccctggat gacattaaag aagggttgag ctggtccctg cctgcatgtg actgtaaatc	1740
cctcccatgt tttctctgag tctcccttg cctgctgagg ctgtatgtgg gctccaggta	1800
acagtgtgt ctccggggcc cctgaactgt gttcatggag catctggctg ggtaggcaca	1860
tgctgggctt gaatccaggg gggactgaat cctcagctta cggacctggg cccatctgtt	1920
tctggagggc tccagtcttc cttgtcctgt cttggagctc ccaagaagga atcacagggg	1980

ES 2 676 146 T3

aggaaccaga taccagccat gaccccaggc tccaccaagc atcttcatgt cccctgctc 2040
 atccccact cccccccacc cagagttgct catcctgcc a gggctggctg tgcccacccc 2100
 aaggctgccc tcttgggggc ccagaaactg cctgatcgtg ccgtggccca gttttgtggc 2160
 atctgcagca acacaagaga gaggacaatg tctctctctt gacccgctgt cacctaacca 2220
 gactcggggc ctgcacctct caggcacttc tggaaaatga ctgaggcaga ttcttctctga 2280
 agcccattct ccatggggca acaaggacac ctattctgtc cttgtccttc catcgtgccc 2340
 ccagaaagcc tcacatatct ccgttttaga tcagggtccct tctccccaga tgaaggaggag 2400
 ggtctctgct ttgttttctc tatctctctc tcagacttga ccaggcccag caggcccag 2460
 aagaccatta ccctatatcc cttctctctc ctagtacat ggccataggc ctgctgatgg 2520
 ctcaggaagg ccattgcaag gactcctcag ctatgggaga ggaagcacat caccattga 2580
 ccccgcaac ccctcccttt cctcctctga gtcccgactg gggccacatg cagcctgact 2640
 tctttgtgcc tgttctgtc cctgcagtct tcagagggcc accgcagctc cagtgccacg 2700
 gcaggaggct gttcctgaat agcccctgtg gtaagggcca ggagagtct tccatcctcc 2760
 aaggccctgc taaaggacac agcagccagg aagtccctg gggccctagc tgaaggacag 2820
 cctgctccct ccgtctctac caggaatggc cttgtcctat ggaaggcact gcccctccc 2880
 aaactaatct aggaatcact gtctaaccac tcactgtcat gaatgtgtac ttaaaggatg 2940
 aggttgagtc ataccaaata gtgatttga tagttcaaaa tggtgaaatt agcaattcta 3000
 catgattcag totaatcaat ggataccgac tgtttccac acaagtctcc tgttctctta 3060
 agcttactca ctgacagcct ttcaactctc acaatacat taaagatatg gccatcacca 3120
 agccccctag gatgacacca gacctgagag tctgaagacc tggatccaag ttctgacttt 3180
 tccccctgac agctgtgtga ccttcgtgaa gtgcgcaaac ctctctgagc ccagtcatt 3240
 gctagtaaga cctgcctttg agttgggtatg atgttcaagt tagataacaa aatgtttata 3300
 ccattagaa cagagaataa atagaactac atttcttgca 3340

<210> 7

<211> 3495

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60
 gtcttgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtccggcctc cgaggaggc ctgcccgtg 120
 ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
 tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggcg 240
 gcagtaagtc ttcagcatca ggcattttgg ggtgactcag taaatggtag atcttgctac 300

10

ES 2 676 146 T3

cagtggaaaca gccactaagg attctgcagt gagagcagag ggccagctaa gtggtactct	360
cccagagact gtctgactca cgccaccccc tccaccttgg acacaggacg ctgtggtttc	420
tgagccagca gcctcccccg ttgcccctct ggatccactg cttaaatacg gacgaggaca	480
gggccctgtc tcctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagtga tgcacaatgc	540
cgtcttctgt ctctgtgggc atcctcctgc tggcaggcct gtgctgcctg gtccctgtct	600
ccctggctga ggatccccag ggagatgctg ccagaagac agatacatcc caccatgatc	660
aggatcacc aaccttcaac aagatcacc ccaacctggc tgagttcgcc ttcagcctat	720
accgccagct ggcacaccag tccaacagca ccaatatctt cttctcccca gtgagcatcg	780
ctacagcctt tgcaatgctc tccttgggga ccaaggctga cactcacgat gaaatcctgg	840
agggcctgaa tttcaacctc acggagattc cggaggctca gatccatgaa ggcttcagg	900
aactcctccg taccctcaac cagccagaca gccagctcca gctgaccacc ggcaatggcc	960
tgttcctcag cgagggcctg aagctagtgg ataagttttt ggaggatgtt aaaaagttgt	1020
accactcaga agccttcact gtcaacttcg gggacaccga agaggccaag aaacagatca	1080
acgattacgt ggagaagggt actcaaggga aaattgtgga tttggtcaag gagcttgaca	1140
gagacacagt ttttgcctg gtgaattaca tcttctttaa aggcaaattg gagagaccct	1200
ttgaagtcaa ggacaccgag gaagaggact tccacgtgga ccaggtgacc accgtgaagg	1260
tgccatgat gaagcgttta ggcatttta acatccagca ctgtaagaag ctgtccagct	1320
gggtgctgct gatgaatac ctgggcaatg ccaccgccat cttcttcctg cctgatgagg	1380
ggaaactaca gcacctgaa aatgaactca cccacgatat catcaccaag ttcttgaaa	1440
atgaagacag aaggtctgcc agcttacatt taccctaaact gtccattact ggaacctatg	1500
atctgaagag cgtcctgggt caactgggca tctaaggt cttcagcaat ggggctgacc	1560
tctccggggt cacagaggag gcaccctga agctctcaa ggccgtgcat aaggctgtgc	1620
tgaccatcga cgagaaagg actgaagctg ctggggccat gtttttagag gccataacca	1680
tgtctatccc ccccagggtc aagttcaaca aacctttgt cttcttaatg attgaacaaa	1740
ataccaagtc tcccctcttc atgggaaaag tggatgaatc caccacaaa taactgcctc	1800
tcgctcctca acccctccc tccatccctg gcccctccc tggatgacat taaagaagg	1860
ttgagctggt ccctgcctgc atgtgactgt aaatccctcc catgttttct ctgagtctcc	1920
ctttgcctgc tgaggctgta tgtgggctcc aggtaacagt gctgtcttcg ggccccctga	1980
actgtgttca tggagcatct ggctgggtag gcacatgctg ggcttgaatc caggggggac	2040
tgaatcctca gcttacggac ctgggcccct ctgtttctgg agggctccag tcttcttgt	2100
cctgtcttgg agtccccaag aaggaatcac aggggaggaa ccagatacca gccatgacc	2160

ES 2 676 146 T3

caggctccac caagcatctt catgtccccc tgtcatccc ccactcccc ccaccagag 2220
 ttgtcatcc tgccagggtt ggctgtgccc accccaaggc tgccctcctg ggggccccag 2280
 aactgcctga togtgccgtg gccagtttt gtggcatctg cagcaacaca agagagagga 2340
 caatgtcttc ctcttgaccc gctgtcacct aaccagactc gggccctgca cctctcaggc 2400
 acttctggaa aatgactgag gcagattctt cctgaagccc attctccatg gggcaacaag 2460
 gacacctatt ctgtccttgt ccttccatcg ctgcccaga aagcctcaca tatctccgtt 2520
 tagaatcagg tcccttctcc ccagatgaag aggaggggtct ctgctttgtt ttctctatct 2580
 cctcctcaga cttgaccagg cccagcaggc cccagaagac cattacccta tatcccttct 2640
 cctccctagt cacatggcca taggcctgct gatggctcag gaaggccatt gcaaggactc 2700
 ctcagctatg ggagaggaag cacatcacc attgaccccc gcaaccctc cctttcctcc 2760
 tctgagctcc gactggggcc acatgcagcc tgacttcttt gtgcctgttg ctgtccctgc 2820
 agtcttcaga gggccaccgc agctccagtg ccacggcagg aggtctgttc tgaatagccc 2880
 ctgtggtaag gggcaggaga gtccctccat cctccaaggc cctgctaaag gacacagcag 2940
 ccaggaagtc ccctgggccc ctagctgaag gacagcctgc tccctccgtc tctaccagga 3000
 atggccttgt cctatggaag gcactgcccc atcccaaact aatctaggaa tcactgtcta 3060
 accactcact gtcatgaatg tgtacttaaa ggatgaggtt gagtcatacc aaatagtgat 3120
 ttogatagtt caaaatggtg aaattagcaa ttctacatga ttcagtctaa tcaatggata 3180
 ccgactgttt ccacacaaag tctcctgttc tcttaagctt actcactgac agcctttcac 3240
 tctccacaaa tacattaaag atatggccat caccaagccc cctaggatga caccagacct 3300
 gagagtctga agacctggat ccaagttctg acttttcccc ctgacagctg tgtgaccttc 3360
 gtgaagtgcg caaacctctc tgagccccag tcattgctag taagacctgc ctttgagttg 3420
 gtatgatgtt caagttagat aacaaaatgt ttatacccat tagaacagag aataaataga 3480
 actacatttc ttgca 3495

<210> 8

<211> 3492

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60
 gtccctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaggc ctagccgctg 120
 ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
 tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggcg 240
 gcagtaagtc ttcagcatca ggcattttgg ggtgactcag taaatggtag atcttgctac 300

10

ES 2 676 146 T3

cagtggaaaca gccactaagg attctgcagt gagagcagag ggccagctaa gtggtactct	360
cccagagact gtctgactca cgcaccccc tccaccttg acacaggacg ctgtggtttc	420
tgagccagcc tccccggtg cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggg	480
ccctgtctcc tcagcttcag gcaccaccac tgacctggga cagtgaatcg acaatgccgt	540
cttctgtctc gtggggcatc ctctgctgg caggcctgtg ctgcctggtc cctgtctccc	600
tggctgagga tcccagggga gatgctgcc agaagacaga tacatccac catgatcagg	660
atcacccaac ctcaacaag atcacccca acctggctga gttcgcttc agcctatacc	720
gccagctggc acaccagtc aacagcacca atatcttctt ctcccagtg agcatcgcta	780
cagcctttgc aatgctctcc ctggggacca aggtgacac tcacgatgaa atcctggagg	840
gcctgaatth caacctcag gagattccgg aggtcagat ccatgaaggc ttccaggaac	900
tcctccgtac cctcaaccag ccagacagcc agctccagct gaccaccggc aatggcctgt	960
tcctcagcga gggcctgaag ctagtggata agtttttga ggatgttaa aagttgtacc	1020
actcagaagc ctactctgc aacttcgggg acaccgaaga ggccaagaaa cagatcaacg	1080
attacgtgga gaagggtact caagggaata ttgtggattt ggtcaaggag cttgacagag	1140
acacagtttt tgctctggtg aattacatct tctttaagg caaatgggag agacccttg	1200
aagtcaagga caccgaggaa gaggacttcc acgtggacca ggtgaccacc gtgaagggtc	1260
ctatgatgaa gcgttttagc atgtttaaca tccagcactg taagaagctg tccagctggg	1320
tgctgctgat gaaatacctg ggcaatgcc cgcctatctt ctctctgcct gatgagggga	1380
aactacagca cctggaaaat gaactcacc acgatatcat caccaagttc ctggaaaatg	1440
aagacagaag gtctgccagc ttacatttac ccaaactgtc cattaactgga acctatgatc	1500
tgaagagcgt cctgggtcaa ctgggcatca ctaaggctct cagcaatggg gctgacctct	1560
ccggggtcac agaggaggca cccctgaagc tctccaaggc cgtgcataag gctgtgctga	1620
ccatcgacga gaaagggaact gaagctgctg gggccatgtt tttagaggcc ataccctgt	1680
ctatccccc cgagggtcaag ttcaacaaac cctttgtctt cttaatgatt gaacaaaata	1740
ccaagtctcc cctcttcatg ggaaaagtgg tgaatccac ccaaaaataa ctgcctctcg	1800
ctcctcaacc cctcccctcc atccctggc cctccctgg atgacattaa agaagggttg	1860
agctggctcc tgctgcatg tgactgtaaa tccctccat gttttctctg agtctccctt	1920
tgctgctga ggtgtatgt gggctccagg taacagtgt gtcttcgggc cccctgaact	1980
gtgttcatgg agcatctggc tgggtaggca catgctgggc ttgaatccag gggggactga	2040
atcctcagct tacggacctg ggcccatctg tttctggagg gctccagtct tcttgteet	2100
gtcttgaggt cccaagaag gaatcacagg ggaggaacca gataccagcc atgacccag	2160
gtccaccaaa gcatcttcat gtcccccgc tcatcccca ctcccccca ccagagttg	2220

ctcatcctgc cagggctggc tgtgccacc ccaaggctgc cctcctggg gcccagaac 2280
 tgctgatcg tgccgtggcc cagttttgtg gcatctgcag caacacaaga gagaggacaa 2340
 tgtcctcctc ttgaccgct gtcacctaac cagactcggg ccctgcacct ctcaggcact 2400
 tctggaaaat gactgaggca gattcttcct gaagccatt ctccatggg caacaaggac 2460
 acctattctg tcttctcct tccatcgctg cccagaaag cctcacatat ctccgtttag 2520
 aatcaggtcc cttctcccca gatgaaggagg aggtctctg ctttgttttc tctatctcct 2580
 cctcagactt gaccaggccc agcaggcccc agaagaccat taccctatat cccttctcct 2640
 ccctagtac atggccatag gcctgctgat ggctcaggaa ggccattgca aggactcctc 2700
 agctatggga gaggaagcac atcacccatt gacccccgca acccctccct ttcctcctct 2760
 gagtcccgac tggggccaca tgcagcctga cttctttgtg cctgttgctg tccctgcagt 2820
 ctccagaggg ccaccgcagc tccagtcca cggcaggagg ctgttcctga atagcccctg 2880
 tggttaagggc caggagagtc cttccatcct ccaaggccct gctaaaggac acagcagcca 2940
 ggaagtcccc tggggcccta gctgaaggac agcctgctcc ctccgtctct accaggaatg 3000
 gccttgtcct atggaaggca ctgccccatc ccaaactaat ctaggaatca ctgtctaacc 3060
 actcactgtc atgaatgtgt acttaaagga tgagggtgag tcataccaaa tagtgatttc 3120
 gatagttcaa aatggtgaaa ttagcaattc tacatgattc agtctaataca atggataccg 3180
 actgtttccc acacaagtct cctgttctct taagcttact cactgacagc ctttcaactc 3240
 ccacaaatac attaaagata tggccatcac caagcccctc aggatgacac cagacctgag 3300
 agtctgaaga cctggatcca agttctgact tttcccctg acagctgtgt gaccttcgtg 3360
 aagtcgcaa acctctctga gcccagtc ttagtagtaa gacctgcctt tgagttggta 3420
 tgatgttcaa gttagataac aaaatgttta taccattag aacagagaat aaatagaact 3480
 acatttcttg ca 3492

<210> 9

<211> 3510

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aacctcaga 60
 gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
 ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
 tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggcg 240
 gcagtaagtc ttcagcatca ggcattttgg ggtgactcag taaatggtag atcttgctac 300
 cagtggaaaca gccactaagg attctgcagt gagagcagag ggccagctaa gtggtactct 360

10

ES 2 676 146 T3

```

cccagagact gtctgactca cgccaccccc tccacotttg acacaggacg ctgtggtttc 420
tgagccaggt acaatgactc ctttcgcctc ccccgttgcc cctctggatc cactgcttaa 480
atacggacga ggacagggcc ctgtctcctc agcttcaggc accaccactg acctgggaca 540
gtgaatcgac aatgccgtct tctgtctcgt ggggcatcct cctgctggca ggctgtgct 600
gcctgggtccc tgtctccctg gctgaggatc cccagggaga tgctgcccag aagacagata 660
catcccacca tgatcaggat caccacacct tcaacaagat ccccccaac ctggctgagt 720
tcgccttcag cctataccgc cagctggcac accagtcaca cagcaccaat atcttcttct 780
ccccagttag catcgctaca gcctttgcaa tgctctccct ggggaccaag gctgacactc 840
acgatgaaat cctggagggc ctgaatttca acctcacgga gattccggag gctcagatcc 900
atgaaggctt ccaggaactc ctccgtaccc tcaaccagcc agacagccag ctccagctga 960
ccaccggcaa tggcctgttc ctccgcaggc gcctgaagct agtgataag tttttggagg 1020
atgttaaaaa gttgtaccac tcagaagcct tcaactgtcaa cttcggggac accgaagagg 1080
ccaagaaaca gatcaacgat tacgtggaga agggactca agggaaaatt gtggatttgg 1140
tcaaggagct tgacagagac acagtttttg ctctggtgaa ttacatcttc tttaaaggca 1200
aatgggagag accctttgaa gtcaaggaca ccgaggaaga ggacttcac gtggaccagg 1260
tgaccaccgt gaagggtgct atgatgaagc gtttaggcat gtttaacatc cagcaactga 1320
agaagctgct cagctgggtg ctgctgatga aatacctggg caatgccacc gccatcttct 1380
tcctgcctga tgaggggaaa ctacagcacc tggaaaatga actcaccac gatatcatca 1440
ccaagttcct ggaaaatgaa gacagaaggt ctgccagctt acatttaccc aaactgtcca 1500
ttactggaac ctatgatctg aagagcgtcc tgggtcaact gggcatcact aaggcttca 1560
gcaatggggc tgacctctcc ggggtcacag aggaggcacc cctgaagctc tccaaggccg 1620
tgcataaggc tgtgctgacc atcgacgaga aagggactga agctgctggg gccatgtttt 1680
tagaggccat acccatgtct atcccccccg aggtcaagtt caacaaaccc tttgtcttct 1740
taatgattga acaaaaatac aagtctcccc tcttcatggg aaaagtgggtg aatcccaccc 1800
aaaaataact gcctctcgtc cctcaacccc tcccctccat ccctggcccc ctccctggat 1860
gacattaaag aagggttgag ctgggtccctg cctgcatgtg actgtaaatc cctcccatgt 1920
tttctctgag tctccctttg cctgctgagg ctgtatgtgg gctccaggta acagtgtgt 1980
cttcggggccc cctgaactgt gttcatggag catctggctg ggtaggcaca tgctgggctt 2040
gaatccaggg gggactgaat cctcagctta cggacctggg cccatctgtt tctggagggc 2100
tccagtcttc cttgtcctgt cttggagtcc ccaagaagga atcacagggg aggaaccaga 2160
taccagccat gacccaggc tccaccaagc atcttcatgt cccctgctc atccccact 2220

```

ES 2 676 146 T3

cccccccacc cagagttgct catcctgcc a gggtggctg tgcccacccc aaggtgccc 2280
 tcctgggggc ccagaaactg cctgatcgtg ccgtggccca gttttgtggc atctgcagca 2340
 acacaagaga gaggacaatg tcctcctctt gaccgcgtgt cacctaacca gactcggggc 2400
 ctgcacctct caggcacttc tggaaaatga ctgaggcaga ttcttcctga agccattct 2460
 ccatggggca acaaggacac ctattctgtc cttgtccttc catcgtgcc ccagaaagcc 2520
 tcacatatct ccgttttagaa tcaggtcctt tctccccaga tgaagaggag ggtctctgct 2580
 ttgttttctc tatctcctcc tcagacttga ccaggcccag caggcccag aagaccatta 2640
 ccctatatcc cttctcctcc ctagtcacat ggccataggc ctgctgatgg ctcaggaagg 2700
 ccattgcaag gactcctcag ctatgggaga ggaagcacat caccattga ccccgcaac 2760
 ccctcccttt cctcctctga gtcccgactg gggccacatg cagcctgact tctttgtgcc 2820
 tgttgctgtc cctgcagtct tcagagggcc accgcagctc cagtgccacg gcaggaggct 2880
 gttcctgaat agcccctgtg gtaagggcca ggagagtcct tccatcctcc aaggccctgc 2940
 taaaggacac agcagccagg aagtccctg gggccctagc tgaaggacag cctgctcct 3000
 ccgtctctac caggaatggc cttgtcctat ggaaggcact gcccacccc aaactaatct 3060
 aggaatcact gtctaaccac tcaactgtcat gaatgtgtac ttaaaggatg aggttgagtc 3120
 ataccaaata gtgatttcga tagttcaaaa tgggtgaaatt agcaattcta catgattcag 3180
 tctaatacat ggataccgac tgtttccac acaagtctcc tgttctctta agcttactca 3240
 ctgacagcct ttcactctcc acaatacat taaagatatg gccatcacca agcccctag 3300
 gatgacacca gacctgagag tctgaagacc tggatccaag ttctgacttt tccccctgac 3360
 agctgtgtga ccttcgtgaa gtgcgcaaac ctctctgagc ccagtcatt gctagtaaga 3420
 cctgcctttg agttgggatg atgttcaagt tagataacaa aatgtttata cccattagaa 3480
 cagagaataa atagaactac atttcttgca 3510

<210> 10

<211> 3303

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 10

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aacctcaga 60
 gtccctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtccggcctc cgagggaaggc ctagccgctg 120
 ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
 tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagcagc 240
 ctccccctgt gccctctggt atccactgct taaatacggg cgaggacagg gccctgtctc 300
 ctcagcttca ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc gacaatgccg tcttctgtct 360

10

ES 2 676 146 T3

cgtggggcat	cctcctgctg	gcaggcctgt	gctgcctggt	cctgtctccc	ctggctgagg	420
atccccaggg	agatgctgcc	cagaagacag	atacatccca	ccatgatcag	gatcacccaa	480
ccttcaacaa	gatcaccccc	aacctggctg	agttcgcctt	cagcctatac	cgccagctgg	540
cacaccagtc	caacagcacc	aatatcttct	tctccccagt	gagcctcgtc	acagcctttg	600
caatgctctc	cctggggacc	aaggctgaca	ctcacgatga	aatcctggag	ggcctgaatt	660
tcaacctcac	ggagattccg	gaggctcaga	tccatgaagg	cttcaggaa	ctcctccgta	720
ccctcaacca	ggcagacagc	cagctccagc	tgaccaccgg	caatggcctg	ttcctcagcg	780
agggcctgaa	gctagtggat	aagtttttgg	aggatgttaa	aaagttgtac	cactcagaag	840
ccttcactgt	caacttcggg	gacaccgaag	aggccaagaa	acagatcaac	gattacgtgg	900
agaagggtao	tcaagggaaa	attgtggatt	tggtcaagga	gcttgacaga	gacacagttt	960
ttgctctggt	gaattacatc	ttctttaaag	gcaaatggga	gagacccttt	gaagtcaagg	1020
acaccgagga	agaggacttc	cacgtggacc	aggtgaccac	cgtgaagggtg	cctatgatga	1080
agcgttttagg	catgttttaac	atccagcact	gtaagaagct	gtccagctgg	gtgctgctga	1140
tgaaatacct	gggcaatgcc	accgccatct	tcttctgcc	tgatgagggg	aaactacagc	1200
acctggaaaa	tgaactcacc	cacgatatca	tcaccaagtt	cctggaaaat	gaagacagaa	1260
ggtctgcag	cttacattta	cccaaactgt	ccattactgg	aacctatgat	ctgaagagcg	1320
tcttgggtca	actgggcata	actaaggctc	tcagcaatgg	ggctgacctc	tccgggggtca	1380
cagaggaggc	acctctgaag	ctctccaagg	ccgtgcataa	ggctgtgctg	accatcgacg	1440
agaaagggac	tgaagctgct	ggggccatgt	ttttagaggc	catacccatg	tctatcccc	1500
ccgagggtcaa	gttcaacaaa	ccctttgtct	tcttaatgat	tgaacaaaat	accaagtctc	1560
ccctcttcat	gggaaaagtg	gtgaatccca	cccaaaaata	actgcctctc	gctcctcaac	1620
ccctccctc	catccctggc	ccctccctg	gatgacatta	aagaagggtt	gagctgggtc	1680
ctgcctgcat	gtgactgtaa	atccctccca	tgttttctct	gagtctccct	ttgcctgctg	1740
aggctgtatg	tgggctccag	gtaacagtgc	tgtcttcggg	ccccctgaac	tgtgttcatg	1800
gagcatctgg	ctgggtaggc	acatgctggg	cttgaatcca	ggggggactg	aatcctcagc	1860
ttacggacct	gggcccctct	gtttctggag	ggctccagtc	ttccttgtcc	tgtcttggag	1920
tccccaaagaa	ggaatcacag	gggaggaacc	agataccagc	catgacccca	ggctccacca	1980
agcatcttca	tgtccctctg	ctcatcccc	actccccccc	accagagtt	gctcatcctg	2040
ccagggtgg	ctgtgcccac	cccaaggctg	ccctcctggg	ggccccagaa	ctgcctgac	2100
gtgccgtggc	ccagttttgt	ggcatctgca	gcaacacaag	agagaggaca	atgtcctcct	2160
cttgaccocg	tgtcacctaa	ccagactcgg	gcctgcacc	tctcaggcac	ttctggaaaa	2220
tgactgaggc	agattcttcc	tgaagcccat	tctccatggg	gcaacaagga	cacctattct	2280

ES 2 676 146 T3

gtccttgtcc ttccatcgct gcccagaaa gcctcacata tctccgttta gaatcaggtc 2340
ccttctcccc agatgaagag gaggggtctct gctttgtttt ctctatctcc tcctcagact 2400
tgaccaggcc cagcaggccc cagaagacca ttacctata tcccttctcc tcctagtca 2460
catggccata ggctgtctga tggctcagga aggccattgc aaggactcct cagctatggg 2520
agaggaagca catcacccat tgacccccgc aaccctccc tttcctcctc tgagtccga 2580
ctggggccac atgcagcctg acttctttgt gcctgttgct gtccctgcag tcttcagagg 2640
gccaccgcag ctccagtgc acggcaggag gctgttcctg aatagccct gtggttaagg 2700
ccaggagagt ccttccatcc tccaaggccc tgctaaagga cacagcagcc aggaagtccc 2760
ctggggccct agctgaagga cagcctgctc cctccgtctc taccaggaat gccttgtcc 2820
tatggaaggc actgccccat cccaaactaa tctaggaatc actgtctaac cactcactgt 2880
catgaatgtg tacttaaaagg atgaggttga gtcataccaa atagtgattt cgatagttca 2940
aaatggtgaa attagcaatt ctacatgatt cagtctaatc aatggatacc gactgtttcc 3000
cacacaagtc tctgttctc ttaagcttac tcaactgacag cctttcactc tccacaaata 3060
cattaaagat atggccatca ccaagcccc taggatgaca ccagacctga gagtctgaag 3120
acctggatcc aagttctgac ttttccccct gacagctgtg tgaccttctg gaagtgcga 3180
aacctctctg agccccagtc attgctagta agacctgcct ttgagtgggt atgatgttca 3240
agttagataa caaatgttt ataccatta gaacagagaa taaatagaac tacatttctt 3300
gca 3303

<210> 11

<211> 3300

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctacccgctg 120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagcctc 240
ccccgttgcc cctctggatc cactgcttaa atacggacga ggacagggcc ctgtctcctc 300
agcttcaggc accaccactg acctgggaca gtgaatcgac aatgccgtct tctgtctcgt 360
ggggcatcct cctgctggca ggctgtgct gcctgggcc tgtctccctg gctgaggatc 420
cccagggaga tgctgcccag aagacagata catcccacca tgatcaggat caccacacct 480
tcaacaagat ccccccaac ctggctgagt tcgccttcag cctataccgc cagctggcac 540
accagtccaa cagcaccaat atcttcttct cccagtgag catcgctaca gcctttgcaa 600

10

ES 2 676 146 T3

tgctctccct	ggggaccaag	gctgacactc	acgatgaaat	cctggagggc	ctgaatttca	660
acctcacgga	gattccggag	gctcagatcc	atgaaggctt	ccaggaactc	ctccgtaccc	720
tcaaccagcc	agacagccag	ctccagctga	ccaccggcaa	tggcctgttc	ctcagcgagg	780
gcctgaagct	agtggataag	tttttgagg	atgttaaaaa	gttgtaccac	tcagaagcct	840
tactgtcaa	cttcggggac	accgaagagg	ccaagaaaca	gatcaacgat	tacgtggaga	900
agggtactca	agggaaaatt	gtggatttgg	tcaaggagct	tgacagagac	acagtttttg	960
ctctggtgaa	ttacatcttc	tttaaaggca	aatgggagag	accctttgaa	gtcaaggaca	1020
ccgaggaaga	ggacttccac	gtggaccagg	tgaccaccgt	gaagggtgcct	atgatgaagc	1080
gtttaggcat	gtttaacatc	cagcactgta	agaagctgtc	cagctgggtg	ctgctgatga	1140
aatacctggg	caatgccacc	gccatcttct	tcctgcctga	tgaggggaaa	ctacagcacc	1200
tggaaaatga	actcaccac	gatatcatca	ccaagttcct	ggaaaatgaa	gacagaaggt	1260
ctgccagctt	acatttacc	aaactgtcca	ttactggaac	ctatgatctg	aagagcgtcc	1320
tgggtcaact	gggcatcact	aaggcttca	gcaatggggc	tgacctctcc	ggggtcacag	1380
aggaggcacc	cctgaagctc	tccaaggccg	tgcataaggc	tgtgctgacc	atcgacgaga	1440
aagggactga	agctgctggg	gccatgtttt	tagaggccat	acccatgtct	atcccccccg	1500
aggccaagtt	caacaaaccc	tttgtcttct	taatgattga	acaaaatacc	aagtctcccc	1560
tcttcatggg	aaaagtgggtg	aatcccaccc	aaaaataact	gcctctcgct	cctcaacccc	1620
tcccctccat	ccctggcccc	ctccctggat	gacattaaag	aagggttgag	ctggtccttg	1680
cctgcatgtg	actgtaaatc	cctcccatgt	tttctctgag	tctccctttg	cctgctgagg	1740
ctgtatgtgg	gctccaggta	acagtgtgtg	cttcggggccc	cctgaactgt	gttcatggag	1800
catctggctg	ggtaggcaca	tgtctgggctt	gaatccaggg	gggactgaat	cctcagctta	1860
cggacctggg	cccatctgtt	tctggagggc	tccagtcttc	cttgtcctgt	cttggaagtcc	1920
ccaagaagga	atcacagggg	aggaaccaga	taccagccat	gaccccaggc	tccaccaagc	1980
atcttcatgt	ccccctgctc	atccccact	cccccccacc	cagagttgct	catcctgcca	2040
gggctggctg	tgcccacccc	aaggctgccc	tcctgggggc	cccagaactg	cctgatcgtg	2100
ccgtggccca	gttttgtggc	atctgcagca	acacaagaga	gaggacaatg	tcctcctctt	2160
gaccgcgtgt	cacctaacca	gactcgggcc	ctgcacctct	caggcacttc	tggaaaatga	2220
ctgaggcaga	ttcttcctga	agccattct	ccatggggca	acaaggacac	ctattctgtc	2280
cttgtccttc	catcgtgcc	ccagaaagcc	tcacatatct	ccgttttagaa	tcaggtccct	2340
tctcccaga	tgaagaggag	ggtctctgct	ttgttttctc	tatctcctcc	tcagacttga	2400
ccaggccag	caggccccag	aagaccatta	ccctatatcc	cttctcctcc	ctagtcacat	2460

ES 2 676 146 T3

ggccataggg ctgctgatgg ctgaggaagg ccattgcaag gactcctcag ctatggggaga 2520
ggaagcacat caccattga ccccgcaac ccctcccttt cctcctctga gtcccgactg 2580
gggccacatg cagcctgact tctttgtgcc tgttgctgtc cctgcagtct tcagagggcc 2640
accgcagctc cagtgccacg gcaggaggct gttcctgaat agcccctgtg gtaagggcca 2700
ggagagtcct tccatcctcc aaggccctgc taaaggacac agcagccagg aagtcccctg 2760
ggcccctagc tgaaggacag cctgctccct ccgtctctac caggaatggc cttgtcctat 2820
ggaaggcact gcccattccc aaactaatct aggaatcact gtctaaccac tcactgtcat 2880
gaatgtgtac ttaaaggatg aggttgagtc ataccaaata gtgatttoga tagttcaaaa 2940
tggtgaaatt agcaattcta catgattcag tctaataat ggataccgac tgtttccac 3000
acaagtctcc tgttctctta agcttactca ctgacagcct ttcactctcc acaatacat 3060
taaagatatg gccatcacca agcccctag gatgacacca gacctgagag tctgaagacc 3120
tggatccaag ttctgacttt tccccctgac agctgtgtga ccttcgtgaa gtcgccaac 3180
ctctctgagc ccagtcatt gctagtaaga cctgcctttg agttggtatg atgttcaagt 3240
tagataacaa aatgtttata ccattagaa cagagaataa atagaactac atttcttgca 3300

<210> 12

<211> 1321

5

<212> ADN

<213> Macaca mulatta

<400> 12

caggacaatg ccattctctg tctcatgggg cgtcctcctg ctggcaggcc tgtgctgcct 60
gtccccggc tctctggctg aggatcccca gggagatgct gccagaaga cggatacatc 120
ccaccatgat caggaccacc caaccctcaa caagatcacc ccagcctgg ctgagttcgg 180
cttcagccta taccgccagc tggcacacca gtccaacagc accaatatct tcttctcccc 240
agtgagcatc gctacagcct ttgcaatgct ctccctgggg accaaggctg aactcacag 300
tgaaatcctg gagggcctga atttcaacgt cacggagatt ccggaggctc aggtccatga 360
aggtttccag gaactcctcc ataccctcaa caagccagac agccagctcc agctgaccac 420
cggcaacggc ctgttctca acaagagcct gaaggtagtg gataagtttt tggaggatgt 480
caaaaaactg taccactcag aagccttctc tgtcaacttt gaggacaccg aagaggccaa 540
gaaacagatc aacaattacg tggagaagga aactcaaggg aaaattgtgg atttgggtcaa 600
ggagcttgac agagacacag tttttgctct ggtgaattac atcttcttta aaggcaaatg 660
ggagagaccc tttgacgttg aggccaccaa ggaagaggac ttccacgtgg accaggcgac 720
cacctgaag gtgcccata tggagggttt aggcattgtt aacatctacc actgtgagaa 780
gctgtccagc tgggtgctgc tgatgaaata cctgggcaat gccaccgcca tcttcttctc 840

10

ES 2 676 146 T3

gcctgatgag gggaaactgc agcacctgga aatgaactc acccatgata tcatcaccaa 900
gttcctggaa aatgaaaaca gcaggtctgc caacttacat ttaccagac tggccattac 960
tggaacctat gatctgaaga cagtccctggg ccacctgggt atcactaagg tcttcagcaa 1020
tggggctgac ctctcgggga tcacggagga ggcaccctg aagctctcca aggccgtgca 1080
taaggctgtg ctgaccatcg atgagaaagg gactgaagct gctggggcca tgtttttaga 1140
ggccataccc atgtctattc cccccgaggt caagttcaac aaacccttg tcttcttaat 1200
gattgaacaa aataccaagt ctccctctt catgggaaaa gtggtgaatc ccaccagaa 1260
ataactgcct gtcactctc agccctccc ctccatccct ggccctcc ctgaatgaca 1320
t 1321

<210> 13

<211> 2064

5

<212> ADN

<213> Macaca mulatta

<400> 13

gccagtcctt gtgtctgcct ggcaatgggc aaggccctt cctgcccaag ctccccgccc 60
ctccccaacc tattgcctcc gccaccgccc acccgaggcc aacttcctgg gtgggcagga 120
actgggccct gtgccaggc cgtgcaactgc ctccacgcag caaccctcag agtactgagc 180
tgagcaaagg aggaggagg gatcagcact ctgaggaagg cctagccact gctgctgcca 240
ggaattccag gggggcatca gtcttcagca tcaggcattt cggggtgaa tagtaaatgg 300
tagatcttgc taccagtga acagccgcta aggattctgc agtgagagca gagggccagc 360
aaagtggtag tctcccagcg actggctgac tcacgccacc ccctccacct tggacgcagg 420
acactgtggt ttctgagcca ggtacaatga ctcttttggt tacgtgcagt ggaggctgta 480
tgctgctcag gcagagcgtc cggacagcgt gggggggcga ctcagcgcgc agcctgtgaa 540
cttagtcctt gtttgctcct ccgtaactg ggggtgatctt ggttaatat caccagcagc 600
ctccccggtt gccctctgc acccactgct taaatacggc caaggacagg gctctgtctc 660
ctcagcctca ggcaccacca ctgacctggg acggtgaatc gacaatgcca tcttctgtct 720
catggggcgt cctcctgctg gcaggcctgt gctgcctgct ccccggtct ctggctgagg 780
atccccagg agatgctgcc cagaagacgg atacatccca ccatgatcag gaccacccaa 840
ccctcaacaa gatcaccccc agcctggctg agttcggctt cagcctatac cgcagctgg 900
cacaccagtc caacagcacc aatatcttct tctccccagt gagcatcgct acagccttg 960
caatgctctc cctggggacc aaggctgaca ctcacagtga aatcctggag ggcctgaatt 1020
tcaacgtcac ggagattccg gaggtcagg tccatgaagg cttccaggaa ctctccata 1080
ccctcaacaa gccagacagc cagctccagc tgaccaccgg caacggcctg ttcctcaaca 1140

10

ES 2 676 146 T3

agagcctgaa ggtagtggat aagtttttgg aggatgtcaa aaaactgtac cactcagaag 1200
 ccttctctgt caactttgag gacaccgaag aggccaagaa acagatcaac aattacgtgg 1260
 agaaggaaac tcaagggaaa attgtggatt tgggtcaagga gcttgacaga gacacagttt 1320
 ttgctctggt gaattacatc ttcttttaaag gcaaattgga gagacccttt gacgttgagg 1380
 ccaccaagga agaggacttc cacgtggacc aggcgaccac cgtgaagggtg cccatgatga 1440
 ggcgttttag catgtttaac atctaccact gtgagaagct gtccagctgg gtgctgctga 1500
 tgaaatacct gggcaatgcc accgccatct tcttcctgcc tgatgagggg aaactgcagc 1560
 acctggaaaa tgaactcacc catgatatac tcaccaagtt cctggaaaat gaaaacagca 1620
 ggtctgccaa cttacattta ccagactgg ccattactgg aacctatgat ctgaagacag 1680
 tcctgggcca cctgggtatc actaagggtct tcagcaatgg ggctgacctc tcggggatca 1740
 cggaggaggc acccctgaag ctctccaagg ccgtgcataa ggctgtgctg accatcgatg 1800
 agaaaggagc tgaagctgct ggggccatgt ttttagaggc catacccatg tctattcccc 1860
 ccgagggtcaa gttcaacaaa ccctttgtct tcttaatatg tgaacaaaat accaagtctc 1920
 ccctcttcat gggaaaagtg gtgaatccca ccagaaaata actgcctgtc actcctcagc 1980
 ccctcccctc catccctggc ccctccctg aatgacatta aagaagggtt gagctggtcc 2040
 ctgcctgcgt gtgtgactgc aaac 2064

<210> 14

<211> 1608

5

<212> ADN

<213> Macaca mulatta

<400> 14

tcttgtgtct gcctggcaat gggcaaggcc ccttcctgcc caagctcccc gccctcccc 60
 aacctattgc ctccgccacc cgccaccga ggccaacttc ctgggtgggc aggaactggg 120
 ccctgtgccc agggcgtgca ctgcctccac gcagcaacct tcagagtact gagctgagca 180
 aaggaggagg aggggatcag cactctgagg aaggcctagc cactgctgct gccaggaatt 240
 ccaggacaat gccatcttct gtctcatggg gcgtcctcct gctggcaggc ctgtgctgcc 300
 tgctccccgg ctctctggct gaggatcccc agggagatgc tgcccagaag acggatacat 360
 cccaccatga tcaggaccac ccaaccctca acaagatcac cccagcctg gctgagttcg 420
 gcttcagcct ataccgccag ctggcacacc agtccaacag caccaatata ttcttctccc 480
 cagtgagcat cgctacagcc tttgcaatgc tctccctggg gaccaaggct gacactcaca 540
 gtgaaatcct ggaggggcctg aatttcaacg tcacggagat tccggaggct caggtccatg 600
 aaggcttcca ggaactcctc cataccctca acaagccaga cagccagctc cagctgacca 660
 ccggcaacgg cctgttcctc aacaagagcc tgaaggtagt ggataagttt ttggaggatg 720

10

ES 2 676 146 T3

tcaaaaaact gtaccactca gaagccttct ctgtcaactt tgaggacacc gaagaggcca	780
agaaacagat caacaattac gtggagaagg aaactcaagg gaaaattgtg gatttgggtca	840
aggagcttga cagagacaca gtttttgctc tgggtgaatta catcttcttt aaaggcaa	900
gggagagacc ctttgacgtt gaggccacca aggaagagga cttccacgtg gaccaggcga	960
ccaccgtgaa ggtgcccatg atgaggcgtt taggcatgtt taacatctac cactgtgaga	1020
agctgtccag ctgggtgctg ctgatgaaat acctgggcaa tgccaccgcc atcttcttcc	1080
tgctgatga ggggaaactg cagcacctgg aaaatgaact caccatgat atcatcacca	1140
agttcctgga aaatgaaaac agcaggctctg ccaacttaca tttaccaga ctggccatta	1200
ctggaaccta tgatctgaag acagtctctg gccacctggg tatcactaag gtcttcagca	1260
atggggctga cctctcgggg atcacggagg aggcaccct gaagctctcc aaggccgtgc	1320
ataaggctgt gctgaccatc gatgagaaag ggactgaagc tgctggggcc atgtttttag	1380
aggccatacc catgtctatt ccccccagg tcaagttcaa caaaccttt gtcttcttaa	1440
tgattgaaca aaataccaag tctccctct tcatgggaaa agtggtgaat cccaccaga	1500
aataactgcc tgtcactcct cagccctcc cctccatccc tggccccctc cctgaatgac	1560
attaaagaag ggttgagctg gtccctgcct gcgtgtgtga ctgcaaac	1608

<210> 15

<211> 3220

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattggg tataaacatt ttgttatcta	60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag	120
gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca	180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgcatc ctagggggct tgggtgatggc catatcttta	240
atgtatttgt ggagagtga aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca	360
ttttgaacta tcgaaatcac tatttgggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc	420
atgacagtga gtgggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc	480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtcgggac tcagaggagg aaaggagggt gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc	780

10

ES 2 676 146 T3

tctcccatag	ctgaggagtc	cttgcaatgg	ccttcctgag	ccatcagcag	gcctatggcc	840
atgtgactag	ggaggagaag	ggatataggg	taatggctct	ctggggcctg	ctgggcctgg	900
tcaagtctga	ggaggagata	gagaaaacaa	agcagagacc	ctcctcttca	tctggggaga	960
agggacctga	ttctaaacgg	agatatgtga	ggctttcttg	ggcagcgatg	gaaggacaag	1020
gacagaatag	gtgtccttgt	tgcccatgg	agaatgggct	tcaggaagaa	tctgcctcag	1080
tcattttcca	gaagtgcctg	agaggtgcag	ggcccagatc	tggttaggtg	acagcgggtc	1140
aagaggagga	cattgtcctc	tctcttgtgt	tgctgcagat	gccacaaaac	tgggccacgg	1200
cacgatcagg	cagttctggg	gccccagga	gggcagcctt	ggggtgggca	cagccagccc	1260
tggcaggatg	agcaactctg	ggtggggggg	agtgggggat	gagcaggggg	acatgaagat	1320
gcttggtgga	gcctggggtc	atggctggta	tctggttcct	cccctgtgat	tccttcttgg	1380
ggactccaag	acaggacaag	gaagactgga	gccctccaga	aacagatggg	cccaggtccg	1440
taagctgagg	attcagtccc	ccctggattc	aagcccagca	tgtgcctacc	cagccagatg	1500
ctccatgaac	acagttcagg	gggcccgaag	acagcactgt	tacctggagc	ccacatacag	1560
cctcagcagg	caaagggaga	ctcagagaaa	acatgggagg	gatttacagt	cacatgcagg	1620
cagggaccag	ctcaaccctt	ctttaatgtc	atccagggag	ggggccaggg	atggagggga	1680
ggggttgagg	agcgagaggc	agttattttt	gggtgggatt	caccactttt	cccatgaaga	1740
ggggagactt	ggtattttgt	tcaatcatta	agaagacaaa	gggtttgttg	aacttgacct	1800
cgggggggat	agacatgggt	atggcctcta	aaaacatggc	cccagcagct	tcagtccctt	1860
tctcgtcgat	ggtcagcaca	gccttatgca	cggccttggg	gagcttcagg	ggtgcctcct	1920
ctgtgacccc	ggagagggtca	gccccattgc	tgaagacctt	agtgatgccc	agttgaccca	1980
ggacgctcct	cagatcatag	gttccagtaa	tggacagttt	gggtaaatgt	aagctggcag	2040
accttctgtc	ttcattttcc	aggaacttgg	tgatgatata	gtgggtgagt	tcattttcca	2100
ggtgctgtag	tttccctca	tcaggcagga	agaagatggc	ggtggcattg	cccaggtatt	2160
tcacagcag	caccagctg	gacagcttct	tacagtgtct	gatgttaaac	atgcctaaac	2220
gcttcatcat	aggcaccttc	acggtgggtca	cctgggtccac	gtggaagtcc	tcttcctcgg	2280
tgctccttgac	ttcaaagggt	ctctcccatt	tgcttttaa	gaagatgtaa	ttcaccagag	2340
caaaaactgt	gtctctgtca	agctccttga	ccaaatccac	aattttccct	tgagtacctt	2400
tctccacgta	atcgttgatc	tgtttcttgg	cctcttcggg	gtccccgaag	ttgacagtga	2460
aggcttctga	gtggtacaac	tttttaacat	cctccaaaaa	cttatccact	agcttcaggc	2520
cctcgtcag	gaacaggcca	ttgccgggtg	tcagctggag	ctggctgtct	ggctggttga	2580
gggtacggag	gagttcctgg	aagccttcat	ggatctgagc	ctccggaatc	tccgtgaggt	2640
tgaaattcag	gccctccagg	atttcacgtg	gagtgtcagc	cttgggtccc	agggagagca	2700

ES 2 676 146 T3

ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcaactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt	2760
gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttggtga	2820
aggttgggtg atcctgatca tggtaggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg	2880
gacccctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc	2940
acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccagggt cagtgggtgt gcctgaagct	3000
gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg	3060
gaggctgctg gtgaatatta accaagggtca cccagttat cggaggagca aacaggggct	3120
aagtccactg gctgggatct gagtgcgccg cctacgctgc ccggacgctt tgcctgggca	3180
gtgtacagct tccactgcac ttaccgaaag gagtcatgtg	3220

<210> 16

<211> 3199

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 16

tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattggg tataaacatt ttgttatcta	60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag	120
gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca	180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgtcatc ctagggggct tgggtgatggc catatcttta	240
atgtatattgt ggagagtgaagg aggtgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca	360
ttttgaacta tcgaaatcac tatttgggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc	420
atgacagtga gtgggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc	480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtccggac tcagaggagg aaaggagggt gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc	780
tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatgggtct ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaattgggt tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agagggtgcag ggcccgagtc tgggttaggtg acagcgggtc	1140

10

ES 2 676 146 T3

aagaggagga cattgtctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagttctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gcctggggtc atggctggtt tctggttcct cccctgtgat tccttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtccc ccttggttc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccaggagg ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttattttt ggggtgggatt caccactttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttggtt aacttgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt	1860
tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttgga gagcttcagg ggtgcctcct	1920
ctgtgacccc ggagagggtc gcccattgc tgaagacctt agtgatgcc agttgacca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaagt aagctggcag	2040
accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatata gtgggtgagt tcattttcca	2100
ggtgctgtag tttccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt	2160
tcacagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtg gatgttaaac atgcctaaac	2220
gcttcacat aggcaccttc acggtggtca cctggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg	2280
tgctcctgac ttcaaagggt ctctccatt tgcctttaa gaagatgtaa ttcaccagag	2340
caaaaactgt gtctctgtca agctcctga ccaaatccac aattttccct tgagtaccct	2400
tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga	2460
aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc	2520
cctcgtgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga	2580
gggtacggag gagttcctgg aagccttcac ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt	2640
tgaattcag gccctccagg atttcacgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca	2700
ttgcaaaggc tgtagcgatg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt	2760
gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga	2820
aggttgggtg atcctgatca tgggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg	2880
gacctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc	2940
acgagacaga agacggcatt gtcccttcct gctctcctca agctctcctc aagctctgtc	3000
tctttctggca ggcacaggag agtggcctga aggctggcag gaggttgccg cccctccaac	3060
ctggaattcc tggcagcagc agcggttagg ccttcctcgg aggcccgacc cctcctcct	3120
tcttggttca gctcaggact ctgaggggtg ctgctggtg gcagtgcag cctggggcac	3180
agtgccaggt tcctgcccc	3199

<210> 17

<211> 3513

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 17

tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattggg tataaacatt ttgttatcta	60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag	120
gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca	180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgcatc ctagggggct tggatgatggc catatcttta	240
atgtatttgt ggagagtga aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca	360
ttttgaacta tcgaaatcac tatttgggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc	420
atgacagtga gtgggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc	480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctagggggc	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtggggac tcagaggagg aaaggagggt gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc	780
tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatgggtctt ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaattgggt tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccgagtc tggttaggtg acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagttctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctgggttct cccctgtgat tccttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccagggtccg	1440

ES 2 676 146 T3

taagctgagg attcagtccc ccttggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt ctttaaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttatTTTT gggTgggatt caccactttt cccatgaaga	1740
gggggagactt ggtatTTTTgt tcaatcatta agaagacaaa gggTttgttg aacttgacct	1800
gggggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt	1860
tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttga gagcttcagg ggtgcctcct	1920
ctgtgacccc ggagaggTca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaagt agctggcag	2040
accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatata gtgggtgagt tcattttcca	2100
ggtgctgtag tttccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt	2160
tcacagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtg gatgttaaac atgcctaaac	2220
gcttcacat aggcacctc acggtggTca cctggTccac gtggaagtcc tcttcctcgg	2280
tgTccttgac ttcaaagggt ctctccatt tgcttttaa gaagatgtaa ttcaccagag	2340
caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaaccac aattttccct tgagtacct	2400
tctccacgta atcgttgatc tgTttcttgg cctcttcggT gtccccgaag ttgacagtga	2460
aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc	2520
cctcgtcag gaacaggcca ttgcgggtgg tcagctggag ctggtgtct ggctggttga	2580
gggtacggag gaggTcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggT	2640
tgaattcag gccctccagg atttcacgt gagtgtcagc cttggTcccc agggagagca	2700
ttgcaaaggc tgtagcgatg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt	2760
gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga	2820
aggTtgggtg atcctgatca tggTgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg	2880
gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc	2940
acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggT cagtggTggt gcctgaagct	3000
gaggagacag gccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg	3060
gaggctcga aaggagtcac tgtacctggc tcagaaacca cagcgtcctg tgtccaaggT	3120
ggagggggTg gcgtgagtca gacagtctct gggagagtac cacttagctg gccctctgct	3180
ctcactgcag aatccttagt ggctgttcca ctggtagcaa gatctacat ttactgagtc	3240
accccaaaat gcctgatgtc gaagacttac tgccgccctt tctgtctctc ctcaagctct	3300
cctcaagctc tgtctctctc ggcaggcaca ggagagtggc ctgaaggctg gcaggaggTt	3360
gccgcccctc caacctggaa ttctggcag cagcagcggc taggccttcc tcggaggccc	3420
gacccctcc tcttcttgg ttcagctcag gactctgagg gttgctgcgt ggaggcagtg	3480
catgccctgg gcacagtgcc cagtctctgc cca	3513

<211> 3236

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 18

tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattggg tataaacatt ttgttatcta	60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag	120
gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca	180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgcatc ctagggggct tggatgatggc catatcttta	240
atgtatttgt ggagagtga aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca	360
ttttgaacta tcgaaatcac tatttgggtat gactcaacct catccttta gtacacattc	420
atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc	480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggac	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtcgggac tcagaggagg aaaggagggt gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc	780
tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaattgggt tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agagggtcag ggcgcgagtc tggtaggtg acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagttctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttgggtga gcctggggtc atggctggta tctgggtcct cccctgtgat tccttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccagggtccg	1440
taagctgagg attcagtcct ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500

ES 2 676 146 T3

ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag 1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg 1620
cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccaggag ggggccaggg atggagggga 1680
ggggttgagg agcgagaggc agttatttt ggggtggatt caccactttt cccatgaaga 1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttggtg aacttgacct 1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtcacct 1860
tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttggg gagcttcagg ggtgcctcct 1920
ctgtgacccc ggagagggtca gcccattgc tgaagacctt agtgatgcc agttgaccca 1980
ggacgctcct cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag 2040
accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca 2100
ggtgctgtag tttccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160
tcacagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtg gatgttaaac atgcctaaac 2220
gcttcacatc aggcacctc acggtggtca cctggtccac gtggaagtc tcttcctcgg 2280
tgtccttgac ttcaaagggt ctctccatt tgcctttaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340
caaaaactgt gtctctgtca agctcctga ccaaaccac aattttccct tgagtacct 2400
tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga 2460
aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520
cctcgctgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctgggtga 2580
gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640
tgaaattcag gccctccagg atttcacgt gagtgtcagc cttgggtccc agggagagca 2700
ttgcaaaggc tgtagcgatg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760
gtgccagctg ggggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttggtga 2820
aggttgggtg atcctgatca tgggtggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880
gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940
acgagacaga agacggcatt gtctgtgga actgagtgag cagcagcagc aatgtccac 3000
ctttcctgct ctctcaagc tctcctcaag ctctgtctct tctggcaggc acaggagagt 3060
ggcctgaagg ctggcaggag gttgcgccc ctccaacctg gaattcctgg cagcagcagc 3120
ggctaggcct tctcggagg cccgaccccc tctccttct tggttcagct caggactctg 3180
agggttgctg cgtggaggca gtgcatgcc tgggcacagt gccagttcc tgccca 3236

<210> 19

<211> 3532

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 19

ES 2 676 146 T3

tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattggg tataaacatt ttgttatcta	60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag	120
gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca	180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgcatc ctagggggct tggatgatggc catatcttta	240
atgtatttgt ggagagtga aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca	360
ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc	420
atgacagtga gtgggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc	480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtggggac tcagaggagg aaaggagggt gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc	780
tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaattgggt tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agagggtcag gggccgagtc tgggttaggtg acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagttctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctgggtcct cccctgtgat tccttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtcct ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgagg acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccaggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttatcttt gggtgggatt caccactttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttggtg aacttgacct	1800

ES 2 676 146 T3

cggggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc ccagcagct tcagtcctt 1860
 tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttga gagcttcagg ggtgcctcct 1920
 ctgtgacccc ggagaggtea gcccattgc tgaagacctt agtgatgcc agttgaccca 1980
 ggaogctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaagt aagctggcag 2040
 accttctgtc ttcatcttcc aggaacttgg tgatgatata gtgggtgagt tcattttcca 2100
 ggtgctgtag tttccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg ccaggtatt 2160
 tcatcagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtg gatgttaaac atgcctaac 2220
 gcttcacat aggcacctc acggtggtea cctgggtccac gtggaagtcc tcttcctcg 2280
 tgccttgac ttcaaagggt ctctccatt tgcctttaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340
 caaaaactgt gtctctgtca agctcctga ccaaaccac aattttccct tgagtacct 2400
 tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga 2460
 aggtctctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520
 cctcgtgag gaacaggcca ttgccggtg tcagctggag ctggctgtct ggtggttga 2580
 ggttacggag gaggctctg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640
 tgaaattcag gccctccagg atttcacgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700
 ttgcaaaggc tgtagcgatg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760
 gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820
 aggttgggtg atcctgatca tgggtggatg tatctgtct ctgggcagca tctccctggg 2880
 gatcctcagc caggagagca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940
 acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggc cagtgggtgt gcctgaagct 3000
 gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060
 gaggctgctg gctcagaaac cacagcgtcc tgtgtccaag gtggaggggg tggcgtgagt 3120
 cagacagtct ctgggagagt accacttagc tggccctctg ctctcactgc agaactctta 3180
 gtggctgttc cactggtagc aagatctacc atttactgag tcaccccaaa atgcctgatg 3240
 ctgaagactt actgccgcc tgtggaactg agtgagcagc agcagcaatg tcccaccttt 3300
 cctgctctcc tcaagctctc ctcaagctct gtctctctg gcaggcacag gagagtggcc 3360
 tgaaggctg caggagggtg ccgcccctcc aacctggaat tcctggcagc agcagcggct 3420
 aggccttcct cggaggcccg acccctcct ccttcttggg tcagctcagg actctgaggg 3480
 ttgctgctg gaggcagtgc atgccctggg cacagtgcc agttcctgcc ca 3532

<210> 20

<211> 3340

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 20

ES 2 676 146 T3

tgcaagaaat gtagttctat ttatttctctg ttctaattggg tataaacatt ttgttatcta	60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag	120
gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca	180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgtcatc ctagggggct tgggtgatggc catatcttta	240
atgtattttgt ggagagtga aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca	360
ttttgaacta tcgaaatcac tatttgggtat gactcaacct catccttta gtacacattc	420
atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtccttcc	480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc	540
caggggactt cctggtgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtcgggac tcagaggagg aaaggagggt gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc	780
tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatgggtctt ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttcttg ggcagcgatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaattgggt tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agagggtcag gggccgagtc tgggttaggtg acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagttctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttctt cccctgtgat tccttcttg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctocaga aacagatggg ccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtcct ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccaggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttattttt ggggtgggatt caccactttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc ccagcagct tcagtccctt	1860

ES 2 676 146 T3

tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttggga gagcttcagg ggtgcctcct 1920
ctgtgacccc ggagaggtea gcccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca 1980
ggacgctcct cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag 2040
accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca 2100
ggtgctgtag tttccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160
tcacagcag caccagctg gacagcttct tacagtgcgt gatgttaaac atgcctaaac 2220
gcttcacatc aggcacctc acggtggtea cctgggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg 2280
tgtccttgac ttcaaagggt ctctccatt tgcctttaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340
caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaaccac aattttccct tgagtaccct 2400
tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggg gtccccgaag ttgacagtga 2460
aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520
cctcgtcgtg gaacaggcca ttgccgggtg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga 2580
gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640
tgaaattcag gccctccagg atttcacgt gagtgtcagc cttgggtccc agggagagca 2700
ttgcaaaggc tgtagcgtg ctcactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760
gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttggtga 2820
aggttgggtg atcctgatca tgggtggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880
gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatcccc 2940
acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtgggtgt gcctgaagct 3000
gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060
gaggctgctg tggaactgag tgagcagcag cagcaatgtc ccacctttcc tgctctcctc 3120
aagctctcct caagctctgt ctcttctggc aggcacagga gagtggcctg aagctggca 3180
ggagggttgc gccctccaa cctggaattc ctggcagcag cagcggctag gccttctcgc 3240
gaggcccgac cccctcctcc ttcttggttc agctcaggac tctgagggtt gctcgttga 3300
ggcagtgcac gccctgggca cagtgccag ttcctgccca 3340

<210> 21

<211> 3495

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 21

tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttotaatggg tataaacatt ttgttatcta 60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120
gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180

10

ES 2 676 146 T3

ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgtcatc ctagggggct tggatgatggc catatcttta	240
atgtatttgt ggagagtgaaggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca	360
ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catccttta gtacacattc	420
atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc	480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctagggggc	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtccggac tcagaggagg aaaggagggt gttcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc	780
tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatatagg taatggctct ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agagggtgag gggccgagtc tggttaggtg acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagttctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttctt cccctgtgat tccttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccttcaga aacagatggg ccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtccc ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttattttt ggggtgggatt caccactttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt	1860
tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttgga gagcttcagg ggtgcctcct	1920
ctgtgacccc ggagaggtca gcccattgc tgaagacctt agtgatgcc agttgacca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag	2040

ES 2 676 146 T3

accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca 2100
 ggtgctgtag tttccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160
 tcatcagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtg gatgttaaac atgcctaaac 2220
 gcttcatcat aggcaccttc acggtggta cctgggtccac gtggaagtcc tcttctcgg 2280
 tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctttaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340
 caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaaccac aattttccct tgagtaccct 2400
 tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcgggt gtccccgaag ttgacagtga 2460
 aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520
 cctcgctgag gaacaggcca ttgccgggtg tcagctggag ctggctgtct ggctgggtga 2580
 gggtagcgag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640
 tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700
 ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcaactggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760
 gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttggtga 2820
 aggttgggtg atcctgatca tgggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880
 gatcctcagc caggagagca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940
 acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtgggtgt gcctgaagct 3000
 gaggagacag ggcctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060
 gaggtgctg gctcagaaac cacagcgtcc tgtgtccaag gtggaggggg tggcgtgagt 3120
 cagacagtct ctgggagagt accacttagc tggccctctg ctctcactgc agaactctta 3180
 gtggctgttc cactggtage aagatctacc atttactgag tcaccccaaa atgcctgatg 3240
 ctgaagactt actgccgccc tttcctgtct tctcaagct ctctcaagc tctgtctctt 3300
 ctggcaggca caggagagt gcctgaaggc tggcaggagg ttgccgcccc tccaacctgg 3360
 aattcctggc agcagcagcg gctaggcctt cctcggaggc ccgacccct cctccttctt 3420
 ggttcagctc aggactctga gggttgctgc gtggaggcag tgcattgccct gggcacagtg 3480
 cccagttcct gccca 3495

<210> 22

<211> 3492

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 22

tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttotaatggg tataaacatt ttgttatcta 60
 acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120
 gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180

10

ES 2 676 146 T3

ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgtcatc ctagggggct tgggtgatggc catatcttta	240
atgtatttgt ggagagtga aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtccggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca	360
ttttgaaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc	420
atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccctcc	480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctagggggc	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcgggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtgcccc	720
cagtccggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc	780
tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccacagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatgggtctt ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctctctttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaattgggt tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agagggtgcag ggcccgagtc tggttagggtg acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtcttc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tggggccagg	1200
cacgatcagg cagttctggg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctgggtcct cccctgtgat tcttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg ccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtccc cctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaaatgtc atccaggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttattttt ggggtgggatt caccactttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttggtg aacttgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc ccagcagct tcagtccctt	1860
tctcgtcagat ggtcagcaca gccttatgca cggccttggg gagcttcagg ggtgcctcct	1920
ctgtgacccc ggagaggcca gcccattgc tgaagacctt agtgatgcc agttgaccca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag	2040
accttctgtc ttcatthtcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca	2100

ES 2 676 146 T3

ggtgctgtag tttccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160
 tcatcagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtg gatgttaaac atgcctaaac 2220
 gcttcatcat aggcaccttc acggtgggtca cctgggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg 2280
 tgtccttgac ttcaaagggt ctctccatt tgccctttaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340
 caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aattttccct tgagtaccct 2400
 tctccacgta atcggtgatc tgtttcttgg cctcttcggg gtccccgaag ttgacagtga 2460
 aggttcttga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520
 cctcgctgag gaacaggcca ttgccgggtg tcagctggag ctggctgtct ggctgggtga 2580
 gggtagcgag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640
 tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700
 ttgcaaaggc tgtagcgatg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760
 gtgccagctg ggggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820
 aggttgggtg atcctgatca tgggtggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880
 gatcctcagc caggagagca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940
 acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggc cagtgggtgg gcctgaagct 3000
 gaggagacag ggcctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060
 gaggtggct cagaaaccac agcgtcctgt gtccaagggt gaggggggtg cgtgagtcag 3120
 acagtctctg ggagagtacc acttagctgg ccctctgtc tcactgcaga atccttagtg 3180
 gctgttccac tggtagcaag atctaccatt tactgagtca ccccaaatg cctgatgctg 3240
 aagacttact gccgccctt cctgctctcc tcaagctctc ctcaagctct gtctcttctg 3300
 gcaggcacag gagagtggcc tgaaggctgg caggagggtg ccgccctcc aacctggaat 3360
 tcctggcagc agcagcggct aggccttct cggaggcccg accccctcct ccttcttggg 3420
 tcagctcagg actctgaggg ttgtgcgtg gaggcagtgc atgccctggg cacagtgcc 3480
 agttcctgcc ca 3492

<210> 23

<211> 3510

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 23

tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattgg tataaacatt ttgttatcta 60
 acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120
 gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180
 ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgtcat ctagggggct tgggtgatgg catatcttta 240

10

ES 2 676 146 T3

atgtatttgt ggagagtgaaggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca	360
ttttgaacta tcgaaatcac tatttgggtat gactcaacct catccttta gtacacattc	420
atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc	480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtccggac tcagaggagg aaaggagggt gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc	780
tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatgggtctt ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctccctctca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaccgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agagggtcag gggccagtc tggttaggtg acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagttctggg gcccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gcctggggtc atggctggtg tctggttctt cccctgtgat tccttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccagggtccg	1440
taagctgagg attcagtcct ccctggatcc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctgagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttattttt ggggtgggatt caccactttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt	1860
tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttgga gagcttcagg ggtgcctcct	1920
ctgtgacccc ggagagggtca gcccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag	2040
accttctgtc ttcatTTTTT aggaacttgg tgatgatata gtgggtgagt tcattttcca	2100

ES 2 676 146 T3

ggtgctgtag tttccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160
 tcatcagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtg gatgttaaac atgcctaaac 2220
 gcttcatcat aggcaccttc acggtgggtca cctgggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg 2280
 tgtccttgac ttcaaagggt ctctccatt tgcctttaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340
 caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaaccac aattttccct tgagtaccct 2400
 tctccacgta atcggtgatc tgtttcttgg cctcttcggg gtccccgaag ttgacagtga 2460
 aggttcttga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520
 cctcgctgag gaacaggcca ttgccgggtg tcagctggag ctggctgtct ggctgggtga 2580
 ggttacggag gaggctcctg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640
 tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700
 ttgcaaaggc tgtagcgatg ctactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760
 gtgccagctg ggggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820
 aggttgggtg atcctgatca tgggtggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880
 gatcctcagc caggagagca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940
 acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggc cagtgggtgg gcctgaagct 3000
 gaggagacag ggcctgtcc tcgtccgtat ttaagcagt gatccagagg ggcaacgggg 3060
 gagggcgaag gagtattgt acctggctca gaaaccacag cgtcctgtgt ccaagggtga 3120
 gggggtggcg tgagtacagc agtctctggg agagtaccac ttagctggcc ctctgctctc 3180
 actgcagaat ccttagtggc tgttccactg gtagcaagat ctaccattta ctgagtcacc 3240
 ccaaaatgcc tgatgctgaa gacttactgc cgccctttcc tgctctctc aagctctcct 3300
 caagctctgt ctcttctggc aggacagga gagtggcctg aaggctggca ggagggtgcc 3360
 gccctccaa cctggaattc ctggcagcag cagcggctag gccttcctcg gagccccgac 3420
 cccctcctcc ttcttgggtc agctcaggac tctgagggtt gctgcgtgga ggcagtgcac 3480
 gccctgggca cagtggccag ttcctgccc 3510

<210> 24

<211> 3303

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 24

tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattgg tataaacatt ttgttatcta 60
 acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120
 gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180
 ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgtcat ctagggggct tgggtgatgg catatcttta 240

10

ES 2 676 146 T3

atgtatttgt ggagagtga aggcgtgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca	360
ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catccttta gtacacattc	420
atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc	480
ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtgcggac tcagaggagg aaaggagggt gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc	780
tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatacagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggctct ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccgagtc tggttaggtg acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtcttc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagtctctgg gcccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttctt cccctgtgat tcttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg ccaggtccg	1440
taagctgagg attcagtccc ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaaatgtc atccaggag ggggccagg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttattttt ggggtgggatt caccactttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttggtg aacttgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt	1860
tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttga gagcttcagg ggtgcctcct	1920
ctgtgacccc ggagaggcca gcccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag	2040
accttctgtc ttcatthtcc aggaacttgg tgatgatata gtgggtgagt tcattttcca	2100
ggtgctgtag ttccctcca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg ccaggtatt	2160

ES 2 676 146 T3

tcatcagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtctg gatgttaaac atgcctaaac	2220
gcttcatcat aggcaccttc acggtggtca cctggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg	2280
tgtccttgac ttcaaagggc ctctccatt tgcctttaa gaagatgtaa ttcaccagag	2340
caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaaccac aattttccct tgagtaccct	2400
tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga	2460
aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc	2520
cctcgctgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga	2580
gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt	2640
tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca	2700
ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcaactggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt	2760
gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttggtga	2820
aggttgggtg atcctgatca tgggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg	2880
gacctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc	2940
acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtgggtgt gcctgaagct	3000
gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg	3060
gaggctgctt tctgtctctc ctcaagctct cctcaagctc tgtctcttct ggcaggcaca	3120
ggagagtggc ctgaaggctg gcaggagggt gccgcccctc caacctggaa ttcctggcag	3180
cagcagcggc taggccttcc tcggaggccc gaccccctcc tccttcttgg ttcagctcag	3240
gactctgagg gttgctgcgt ggaggcagtg catgccctgg gcacagtgc cagttcctgc	3300
cca	3303

<210> 25

<211> 3300

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 25

tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaattggg tataaacatt ttgttatcta	60
acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag	120
gtttggcgcg ttacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtacaga cttggatcca	180
ggtcttcaga ctctcaggtc tgggtgcatc ctagggggct tgggtgatggc catatcttta	240
atgtatttgt ggagagtgaagggtgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt	300
gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca	360
ttttgaacta tcgaaatcac tatttgggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc	420
atgacagtga gtgggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc	480

10

ES 2 676 146 T3

ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctagggggc	540
caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc	600
tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt	660
ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc	720
cagtccggac tcagaggagg aaaggagggt gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc	780
tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc	840
atgtgactag ggaggagaag ggatataagg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg	900
tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctctcttca tctggggaga	960
agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag	1020
gacagaatag gtgtccttgt tgcccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag	1080
tcattttcca gaagtgcctg agagggtcag gggccgagtc tggttagggt acagcgggtc	1140
aagaggagga cattgtctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg	1200
cacgatcagg cagtctctgg gccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc	1260
tggcaggatg agcaactctg ggtggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat	1320
gcttggtgga gcctggggtc atggctggtg tctggttctt cccctgtgat tccttcttgg	1380
ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccagggtccg	1440
taagctgagg attcagtccc ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg	1500
ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag	1560
cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg	1620
cagggaccag ctcaaccctt cttaaatgtc atccaggag ggggccaggg atggagggga	1680
ggggttgagg agcgagaggc agttattttt ggggtgggatt caccactttt cccatgaaga	1740
ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct	1800
cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt	1860
tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttga gagcttcagg ggtgcctcct	1920
ctgtgacccc ggagagggtc gcccattgc tgaagacctt agtgatgcc agttgacca	1980
ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag	2040
accttctgtc ttcatTTTTc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca	2100
ggtgctgtag tttccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggattt	2160
tcacagcag caccagctg gacagcttct tacagtgtg gatgttaaac atgcctaaac	2220
gcttcatcat aggcaccttc acggtggtca cctggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg	2280
tgctcctgac ttcaaagggt ctctcccat tgcctttaa gaagatgtaa ttcaccagag	2340

ES 2 676 146 T3

caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaattccac aattttccct tgagtaccct 2400
tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga 2460
aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520
cctcgctgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctgggtga 2580
gggtacggag gaggttcctgg aagccttcac ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640
tgaaattcag gccctccagg atttcacgtg gagtgtcagc cttgggtccc agggagagca 2700
ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcaactggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760
gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttggtga 2820
aggttgggtg atcctgatca tgggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880
gatcctcagc caggagagca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940
acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtgggtgt gcctgaagct 3000
gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060
gaggctttcc tgctctcctc aagctctcct caagctctgt ctcttctggc aggcacagga 3120
gagtggcctg aaggctggca ggaggttgcc gccctccaa cctggaattc ctggcagcag 3180
cagcggctag gccttcctcg gaggcccgac cccctcctcc ttcttggttc agctcaggac 3240
tctgaggggt gctgcgtgga ggcagtgcac gccctgggca cagtgccagc ttcctgccca 3300

<210> 26

<211> 1321

5

<212> ADN

<213> Macaca mulatta

<400> 26

atgtcattca gggagggggc cagggatgga ggggaggggc tgaggagtga caggcagtta 60
tttctgggtg ggattcacca cttttcccat gaagagggga gacttggat tttgttcaat 120
cattaagaag acaaagggtt tggtgaactt gacctcgggg ggaatagaca tgggtatggc 180
ctctaaaaac atggccccag cagcttcagt ccttttctca tcgatggtca gcacagcctt 240
atgcacggcc ttggagagct tcaggggtgc ctctccgtg atccccgaga ggtcagcccc 300
attgctgaag accttagtga taccaggtg gccaggact gtcttcagat cataggttcc 360
agtaatggcc agtctgggtg aatgtaagtt ggcagacctg ctgttttcat tttccaggaa 420
cttgggtgatg atatcatggg tgagttcatt ttccaggtgc tgcagtttcc cctcatcagg 480
caggaagaag atggcggtgg cattgccacg gtatttcac agcagcacc agctggacag 540
cttctcacag tggtagatgt taaacatgcc taaacgcctc atcatgggca ccttcacggt 600
ggctgcctgg tccacgtgga agtcctcttc cttgggtggc tcaacgtcaa agggctcttc 660
ccatttgcct ttaaagaaga tgtaattcac cagagcaaaa actgtgtctc tgtcaagctc 720

10

ES 2 676 146 T3

cttgaccaaa tccacaatth tcccttgagt ttcccttctcc acgtaattgt tgatctgttt 780
cttggcctct tcggtgtcct caaagttgac agagaaggct tctgagtggc acagtttttt 840
gacatcctcc aaaaacttat ccactacctt caggctcttg ttgaggaaca ggccgttgcc 900
ggtggtcagc tggagctggc tgtctggctt gttgagggtg tggaggagtt cctggaagcc 960
ttcatggacc tgagcctccg gaatctccgt gacgttgaaa ttcaggccct ccaggatttc 1020
actgtgagtg tcagccttgg tccccaggga gagcattgca aaggctgtag cgatgctcac 1080
tggggagaag aagatattgg tgctgttggg ctggtgtgcc agctggcggc ataggctgaa 1140
gccgaactca gccaggctgg ggtgatctt gttgagggtt ggggtggtct gatcatggtg 1200
ggatgtatcc gtcttctggg cagcatctcc ctggggatcc tcagccagag agccggggag 1260
caggcagcac aggcctgccg gcaggaggac gccccatgag acagaagatg gcattgtcct 1320
g 1321

<210> 27

<211> 2064

5

<212> ADN

<213> Macaca mulatta

<400> 27

gtttgcagtc acacacgcag gcagggacca gctcaaccct tctttaatgt cattcaggga 60
ggggggccagg gatggagggg aggggctgag gagtgacagg cagttatttc tgggtgggat 120
tcaccacttt tcccatgaag aggggagact tggatatttg ttcaatcatt aagaagacaa 180
agggtttggt gaacttgacc tcggggggaa tagacatggg tatggcctct aaaaacatgg 240
ccccagcagc ttcagtcctt ttctcatcga tggtcagcac agccttatgc acggccttgg 300
agagcttcag ggggtgcctc tcctgatcc ccgagaggc agcccatg ctgaagacct 360
tagtgatacc cagggtggcc aggaactgtc tcagatcata ggttccagta atggccagtc 420
tgggtaaatg taagttggca gacctgtgt tttcattttc caggaaactg gtgatgatat 480
catgggtgag ttcattttcc aggtgctgca gtttccctc atcaggcagg aagaagatgg 540
cggtggcatt gccagggtat ttcacagca gcaaccagct ggacagcttc tcacagtggc 600
agatgttaaa catgcctaaa cgcctcatca tgggcacctt cacggtggc gcctgggtcca 660
cgtggaagtc ctcttccttg gtggcctcaa cgtcaaaggg tctctcccat ttgcctttaa 720
agaagatgta attcaccaga gcaaaaactg tgtctctgtc aagctccttg accaaatcca 780
caattttccc ttgagtttcc ttctccacgt aattggtgat ctgtttcttg gcctcttcgg 840
tgtcctcaaa gttgacagag aaggcttctg agtgggtacag ttttttgaca tcctccaaaa 900
acttatccac taccttcagg ctcttggtga ggaacaggcc gttgccgggtg gtcagctgga 960
gctggctgtc tggcttgttg aggggtatgga ggagttcctg gaagccttca tggacctgag 1020

10

ES 2 676 146 T3

cctccggaat ctccgtgacg ttgaaattca ggccctccag gatttcaactg tgagtgtcag 1080
ccttggtccc cagggagagc attgcaaagg ctgtagcgat gctcaactggg gagaagaaga 1140
tattggtgct gttggactgg tgtgccagct ggcggtatag gctgaagccg aactcagcca 1200
ggctgggggt gatcttgttg agggttgggt ggtcctgatc atgggtgggat gtatccgtct 1260
tctgggcagc atctccctgg ggatcctcag ccagagagcc ggggagcagg cagcacaggc 1320
ctgccagcag gaggacgccc catgagacag aagatggcat tgtcgattca ccgtcccagg 1380
tcagtgggtg tgectgagge tgaggagaca gagccctgtc cttgtccgta tttaagcagt 1440
gggtgcagag gggcaacggg ggaggctgct ggtgaatatt aaccaagatc accccagtta 1500
ccggaggagc aaacagggac taagttcaca ggctgggccc tgagtcgccc gcccacgctg 1560
tccggacgct ctgcctgagc agcatacagc ctccactgca cgtacccaaa ggagtcattg 1620
tacctggctc agaaaccaca gtgtcctgcg tccaaggtgg agggggtggc gtgagtcagc 1680
cagtcgctgg gagagtacca ctttgcctggc cctctgctct cactgcagaa tccttagcgg 1740
ctgttccact ggtagcaaga tctaccattt actaattcac cccgaaatgc ctgatgctga 1800
agactgatgc cgccctggaa ttcttggcag cagcagtggc taggccttc tcagagtgtc 1860
gatccctcc tcctcctttg ctcagctcag tactctgagg gttgctgcgt ggaggcagtg 1920
cacgccttg gcacagggcc cagtccctgc ccaccagga agttggcctc gggtgggggg 1980
tggcggaggc aataggttgg ggaggggagg ggagcttggg caggaagggg ccttgcccat 2040
tgccaggcag acacaagact gggc 2064

<210> 28

<211> 1608

5

<212> ADN

<213> Macaca mulatta

<400> 28

gtttgcagtc acacacgcag gcagggacca gctcaaccct tctttaatgt cattcaggga 60
gggggcccagg gatggagggg aggggctgag gagtgcagag cagttatttc tgggtgggat 120
tcaccacttt tcccatgaag aggggagact tggatatttg ttcaatcatt aagaagacaa 180
agggtttgtt gaacttgacc tcggggggaa tagacatggg tatggcctct aaaaacatgg 240
ccccagcagc ttcagtcctt ttctcatcga tggtcagcac agccttatgc acggccttgg 300
agagcttcag ggggtgcctc tccgtgatcc ccgagaggtc agccccattg ctgaagacct 360
tagtgatacc caggtggccc aggactgtct tcagatcata gggtccagta atggccagtc 420
tgggtaaatg taagttggca gacctgctgt tttcattttc caggaacttg gtgatgatat 480
catgggtgag ttcatcttcc aggtgctgca gtttccctc atcaggcagg aagaagatgg 540
cggtggcatt gccaggtat ttcatcagca gcaccagct ggacagcttc tcacagtgg 600

10

ES 2 676 146 T3

agatgttaaa catgcctaaa cgcctcatca tgggcacctt cacggtggtc gcctgggtcca 660
 cgtggaagtc ctcttccttg gtggcctcaa cgtcaaaggg tctctcccat ttgcctttaa 720
 agaagatgta attcaccaga gcaaaaactg tgtctctgtc aagctccttg accaaatcca 780
 caattttccc ttgagtttcc ttctccacgt aattgttgat ctgtttcttg gcctcttcgg 840
 tgtcctcaaa gttgacagag aaggcttctg agtggtacag ttttttgaca tcctccaaaa 900
 acttatccac taccttcagg ctcttggtga ggaacaggcc gttgccgggtg gtcagctgga 960
 gctggctgtc tggcttggtg agggatatga ggagttcctg gaagccttca tggacctgag 1020
 cctccggaat ctccgtgacg ttgaaattca ggccctccag gatttcactg tgagtgtcag 1080
 ccttggtccc caggagagac attgcaaagg ctgtagcgat gctcactggg gagaagaaga 1140
 tattggtgct gttggactgg tgtgccagct ggcggtatag gctgaagccg aactcagcca 1200
 ggctgggggt gatcttggtg agggttgggt ggtcctgatc atggtgggat gtatccgtct 1260
 tctgggcagc atctccctgg ggatcctcag ccagagagcc ggggagcagg cagcacaggc 1320
 ctgccagcag gaggacgccc catgagacag aagatggcat tgcctggaa ttcctggcag 1380
 cagcagtggc taggccttcc tcagagtgtc gatcccctcc tcctcctttg ctcagctcag 1440
 tactctgagg gttgctgctg ggaggcagtg cacgccctgg gcacagggcc cagttcctgc 1500
 ccaccagga agttggcctc ggggtggcggg tggcggaggc aataggttgg ggaggggagg 1560
 ggagcttggg caggaagggg ccttgcccat tgccaggcag acacaaga 1608

<210> 29

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de desconocido: péptido RFGF"

10

<400> 29

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15

15 <210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Desconocido

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de desconocido: péptido análogo de RFGF"

<400> 30

5

Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
1 5 10

<210> 31

<211> 13

10

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 31

15

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

20

<213> Drosophila sp.

<400> 32

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

25

<210> 33

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

35

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético"

<400> 33

5 cuuacgcuga guacuucgat t 21

<210> 34

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

15

<400> 34

actaaggtct tcagcaatgg g 21

<210> 35

20 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 35

gcttcagtcc cttctcatc g 21

30

<210> 36

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"

<400> 36

tggtcagcac agccttatgc acg 23

5

<210> 37

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

15

<400> 37

gcatcctggg ctactactga 19

<210> 38

<211> 20

20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 38

tgggtgtcgc tgtgaagtc 20

30

<210> 39

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sonda sintética"

<400> 39
16 ccaggtgggc tcctcc

<210> 40
5 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<220>
15 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético"

<400> 40
ucgaaguacu cagcguaagt t 21

20 <210> 41
<211> 21
<212> ARN
<213> Homo sapiens

25 <400> 41
guccaacagc accaauaucu u 21

<210> 42
<211> 21
30 <212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 42
guccaacagc accaauaucu u 21

35 <210> 43
<211> 21

	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 43	
5	uaaugauuga acaaaauacc a	21
	<210> 44	
	<211> 21	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 44	
	uaaugauuga acaaaauacc a	21
15	<210> 45	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 45	
	cuucuuaug auugaacaaa a	21
	<210> 46	
	<211> 21	
25	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 46	
	cuucuuaug auugaacaaa a	21
30	<210> 47	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 47	
	auugaacaaa auaccaaguc u	21

	<210> 48	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 48	
	auugaacaaa auaccaaguc u	21
	<210> 49	
10	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 49	
15	uucuuaauga uugaacaaaa u	21
	<210> 50	
	<211> 21	
	<212> ARN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 50	
	uucuuaauga uugaacaaaa u	21
25	<210> 51	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 51	
	caaaccuuu gucuucuuaa u	21
	<210> 52	
	<211> 21	
35	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 52	
	caaaccuuu gucuucuuaa u	21
	<210> 53	
5	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 53	
10	ugucuucuua augauugaac a	21
	<210> 54	
	<211> 21	
	<212> ARN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 54	
	ugucuucuua augauugaac a	21
20	<210> 55	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 55	
	caccuggaaa augaacucac c	21
	<210> 56	
	<211> 21	
30	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 56	
	caccuggaaa augaacucac c	21
35	<210> 57	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 57	
5	uuuugcucug gugaauuaca u	21
	<210> 58	
	<211> 21	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 58	
	uuuugcucug gugaauuaca u	21
15	<210> 59	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 59	
	acccuuuguc uucuaauga u	21
	<210> 60	
	<211> 21	
25	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 60	
	acccuuuguc uucuaauga u	21
30		
	<210> 61	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35		
	<400> 61	
	uugaacaaaa uaccaagucu c	21

	<210> 62	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 62	
	uugaacaaaa uaccaagucu c	21
	<210> 63	
10	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 63	
15	guucaacaaa cccuuugucu u	21
	<210> 64	
	<211> 21	
	<212> ARN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 64	
	guucaacaaa cccuuugucu u	21
25	<210> 65	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 65	
	aaauaccaag ucuccccucu u	21
	<210> 66	
	<211> 21	
35	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 66	
	aaauaccaag ucuccccucu u	21
5	<210> 67	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 67	
	uuuuugcucu ggugaauuac a	21
15	<210> 68	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 68	
	uuuuugcucu ggugaauuac a	21
25	<210> 69	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 69	
	aguucaacaa acccuuuguc u	21
35	<210> 70	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 70	
	aguucaacaa acccuuuguc u	21
	<210> 71	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 71	
5	aaugauugaa caaaauacca a	21
	<210> 72	
	<211> 21	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 72	
	aaugauugaa caaaauacca a	21
15	<210> 73	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 73	
	uacuggaacc uaugaucuga a	21
	<210> 74	
	<211> 21	
25	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 74	
	uacuggaacc uaugaucuga a	21
30	<210> 75	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 75	
	acauuaaaga agggugagc u	21

	<210> 76	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 76	
	acauuaaaga agggguugagc u	21
	<210> 77	
10	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 77	
15	aaaauugugg auuuggucaa g	21
	<210> 78	
	<211> 21	
	<212> ARN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 78	
	aaaauugugg auuuggucaa g	21
25	<210> 79	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 79	
	auuacuggaa ccuaugaucu g	21
	<210> 80	
	<211> 21	
35	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 80	
	auuacuggaa ccuaugaucu g	21
5	<210> 81	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 81	
	cacaguuuuu gcucugguga a	21
	<210> 82	
	<211> 21	
	<212> ARN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 82	
	cacaguuuuu gcucugguga a	21
20	<210> 83	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 83	
	uuaaagaagg guugagcugg u	21
	<210> 84	
	<211> 21	
30	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 84	
	uuaaagaagg guugagcugg u	21
35	<210> 85	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 85	
5	agugagcauc gcuacagccu u	21
	<210> 86	
	<211> 21	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 86	
	agugagcauc gcuacagccu u	21
15	<210> 87	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 87	
	aaggagcuug acagagacac a	21
	<210> 88	
	<211> 21	
25	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 88	
	aaggagcuug acagagacac a	21
30	<210> 89	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 89	
	guggauaagu uuuuggagga u	21

	<210> 90	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 90	
	guggauaagu uuuuggagga u	21
	<210> 91	
10	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 91	
15	gauugaacaa aaauaccaagu c	21
	<210> 92	
	<211> 21	
	<212> ARN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 92	
	gauugaacaa aaauaccaagu c	21
25	<210> 93	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 93	
	gcucuccaag gccgugcaua a	21
	<210> 94	
	<211> 21	
35	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 94	
	gcucuccaag gccgugcaua a	21
	<210> 95	
5	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 95	
10	accuggaaaa ugaacucacc c	21
	<210> 96	
	<211> 21	
	<212> ARN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 96	
	accuggaaaa ugaacucacc c	21
20	<210> 97	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 97	
	gggaccaagg cugacacuca c	21
	<210> 98	
	<211> 21	
30	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 98	
	gggaccaagg cugacacuca c	21
35	<210> 99	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 99	
5	gccauguuuu uagaggccau a	21
	<210> 100	
	<211> 21	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 100	
	gccauguuuu uagaggccau a	21
15	<210> 101	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 101	
	ccuggaaaau gaacucaccc a	21
	<210> 102	
	<211> 21	
25	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 102	
	ccuggaaaau gaacucaccc a	21
30	<210> 103	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 103	
	aagaggccaa gaaacagauc a	21

	<210> 104	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 104	
	aagaggccaa gaaacagauc a	21
	<210> 105	
10	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 105	
15	ggcaaauggg agagaccuu u	21
	<210> 106	
	<211> 21	
	<212> ARN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 106	
	ggcaaauggg agagaccuu u	21
25	<210> 107	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 107	
	ugggaaaagu ggugaauccc a	21
	<210> 108	
	<211> 21	
35	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 108	
	ugggaaaagu ggugaauccc a	21
	<210> 109	
5	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 109	
10	ggggaccaag gcugacacuc a	21
	<210> 110	
	<211> 21	
	<212> ARN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 110	
	ggggaccaag gcugacacuc a	21
20	<210> 111	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 111	
	gacauaaaag aagguugag c	21
	<210> 112	
	<211> 21	
30	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 112	
	gacauaaaag aagguugag c	21
35	<210> 113	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 113	
5	ggccauguuu uuagaggcca u	21
	<210> 114	
	<211> 21	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 114	
	ggccauguuu uuagaggcca u	21
15	<210> 115	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 115	
	uuccugccug augaggggaa a	21
	<210> 116	
	<211> 21	
25	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 116	
	uuccugccug augaggggaa a	21
30	<210> 117	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 117	
	cucuccaagg ccgugcauaa g	21

	<210> 118	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 118	
	cucuccaagg ccgugcauaa g	21
	<210> 119	
10	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 119	
15	agcucuccaa ggccgugcau a	21
	<210> 120	
	<211> 21	
	<212> ARN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 120	
	agcucuccaa ggccgugcau a	21
25	<210> 121	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 121	
	uccuggaggg ccugaauuuc a	21
	<210> 122	
	<211> 21	
35	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 122	
	uccuggaggg ccugaauuc a	21
5	<210> 123	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 123	
	uuggucaagg agcuugacag a	21
	<210> 124	
	<211> 21	
	<212> ARN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 124	
	uuggucaagg agcuugacag a	21
20	<210> 125	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 125	
	uuuggucaag gagcuugaca g	21
	<210> 126	
	<211> 21	
30	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 126	
	uuuggucaag gagcuugaca g	21
35	<210> 127	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 127	
5	uccccaguga gcaucgcuac a	21
	<210> 128	
	<211> 21	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 128	
	uccccaguga gcaucgcuac a	21
15	<210> 129	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 129	
	aagauauugg ugcuguugga cug	23
	<210> 130	
	<211> 23	
25	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 130	
	aagauauugg ugcuguugga cug	23
30	<210> 131	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 131	
	ugguauuuug uucaaucauu aag	23

	<210> 132	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 132	
	ugguauuuug uucaaucauu aag	23
	<210> 133	
10	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 133	
15	uuuuguucaa ucauuuagaa gac	23
	<210> 134	
	<211> 23	
	<212> ARN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 134	
	uuuuguucaa ucauuuagaa gac	23
25	<210> 135	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 135	
	agacuuggua uuuuguucaa uca	23
	<210> 136	
	<211> 23	
35	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 136	
	agacuuggua uuuuguucaa uca	23
5	<210> 137	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 137	
	auuuuguuca aucauuaaga aga	23
	<210> 138	
	<211> 23	
	<212> ARN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 138	
	auuuuguuca aucauuaaga aga	23
20	<210> 139	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 139	
	auuaagaaga caaaggguuu guu	23
	<210> 140	
	<211> 23	
30	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 140	
	auuaagaaga caaaggguuu guu	23
35	<210> 141	
	<211> 23	

	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 141	
5	uguucaauca uuaagaagac aaa	23
	<210> 142	
	<211> 23	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 142	
	uguucaauca uuaagaagac aaa	23
15	<210> 143	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 143	
	ggugaguuca uuuuccaggu gcu	23
	<210> 144	
	<211> 23	
25	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 144	
	ggugaguuca uuuuccaggu gcu	23
30	<210> 145	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 145	
	auguaauuca ccagagcaaa aac	23

	<210> 146	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 146	
	auguaauuca ccagagcaaa aac	23
	<210> 147	
10	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 147	
15	aucuuuaaga agacaaaggg uuu	23
	<210> 148	
	<211> 23	
	<212> ARN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 148	
	aucuuuaaga agacaaaggg uuu	23
25	<210> 149	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 149	
	gagacuuggu auuuuguuca auc	23
	<210> 150	
	<211> 23	
35	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 150	
	gagacuuggu auuuuguuca auc	23
5	<210> 151	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 151	
	aagacaaagg guuuguugaa cuu	23
	<210> 152	
	<211> 23	
	<212> ARN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 152	
	aagacaaagg guuuguugaa cuu	23
20	<210> 153	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 153	
	aagaggggag acuugguauu uug	23
	<210> 154	
	<211> 23	
30	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 154	
	aagaggggag acuugguauu uug	23
35	<210> 155	
	<211> 23	

	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 155	
5	uguaauucac cagagcaaaa acu	23
	<210> 156	
	<211> 23	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 156	
	uguaauucac cagagcaaaa acu	23
15	<210> 157	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 157	
	agacaaaggg uuuguugaac uug	23
	<210> 158	
	<211> 23	
25	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 158	
30	agacaaaggg uuuguugaac uug	23
	<210> 159	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 159	
	uugguauuuu guucaucau uaa	23

	<210> 160	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 160	
	uugguauuuu guucaaucau uaa	23
	<210> 161	
10	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 161	
15	uucagaucau agguuccagu aa	23
	<210> 162	
	<211> 23	
	<212> ARN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 162	
	uucagaucau agguuccagu aa	23
25	<210> 163	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 163	
	agcucaaccc uucuuuaug uca	23
	<210> 164	
	<211> 23	
35	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 164	
	agcucaaccc uucuuuaug uca	23
5	<210> 165	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 165	
	cuugaccaa uccacaauu ucc	23
	<210> 166	
	<211> 23	
	<212> ARN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 166	
	cuugaccaa uccacaauu ucc	23
20	<210> 167	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 167	
	cagaucauag guuccaguaa ugg	23
	<210> 168	
	<211> 23	
30	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 168	
35	cagaucauag guuccaguaa ugg	23
	<210> 169	
	<211> 23	

	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 169	
5	uucaccagag caaaaacugu guc	23
	<210> 170	
	<211> 23	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 170	
	uucaccagag caaaaacugu guc	23
15	<210> 171	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 171	
	accagcucaa cccuucuuua aug	23
	<210> 172	
	<211> 23	
25	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 172	
	accagcucaa cccuucuuua aug	23
30	<210> 173	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 173	
	aaggcuguag cgaugcucac ugg	23

	<210> 174	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 174	
	aaggcuguag cgaugcucac ugg	23
	<210> 175	
10	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 175	
15	ugugucucug ucaagcuccu uga	23
	<210> 176	
	<211> 23	
	<212> ARN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 176	
	ugugucucug ucaagcuccu uga	23
25	<210> 177	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 177	
	auccuccaaa aacuuaucca cua	23
	<210> 178	
	<211> 23	
35	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 178	
	auccuccaaa aacuuaucca cua	23
5	<210> 179	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 179	
	gacuugguau uuuguucaau cau	23
	<210> 180	
	<211> 23	
	<212> ARN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 180	
	gacuugguau uuuguucaau cau	23
20	<210> 181	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 181	
	uuauhcacgg ccuuggagag cuu	23
	<210> 182	
	<211> 23	
30	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 182	
	uuauhcacgg ccuuggagag cuu	23
35	<210> 183	
	<211> 23	

	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 183	
5	gggugaguuc auuuuccagg ugc	23
	<210> 184	
	<211> 23	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 184	
	gggugaguuc auuuuccagg ugc	23
15	<210> 185	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 185	
	gugaguguca gccuuggucc cca	23
	<210> 186	
	<211> 23	
25	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 186	
	gugaguguca gccuuggucc cca	23
30		
	<210> 187	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35		
	<400> 187	
	uauggccucu aaaaacaugg ccc	23

	<210> 188	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 188	
	uauggccucu aaaaacaugg ccc	23
	<210> 189	
10	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 189	
15	ugggugaguu cauuuuccag gug	23
	<210> 190	
	<211> 23	
	<212> ARN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 190	
	ugggugaguu cauuuuccag gug	23
25	<210> 191	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 191	
	ugaucuguuu cuuggccucu ucg	23
	<210> 192	
	<211> 23	
35	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 192	
	ugaucuguuu cuuggccucu ucg	23
5	<210> 193	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 193	
	aaagggucuc ucccauuugc cuu	23
	<210> 194	
	<211> 23	
	<212> ARN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 194	
	aaagggucuc ucccauuugc cuu	23
20	<210> 195	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 195	
	ugggauucac cacuuuuccc aug	23
	<210> 196	
	<211> 23	
30	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 196	
	ugggauucac cacuuuuccc aug	23
35	<210> 197	
	<211> 23	

	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 197	
5	ugagugucag ccuugguccc cag	23
	<210> 198	
	<211> 23	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 198	
	ugagugucag ccuugguccc cag	23
15	<210> 199	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 199	
	gcucaacccu ucuuuuauugu cau	23
	<210> 200	
	<211> 23	
25	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 200	
	gcucaacccu ucuuuuauugu cau	23
30	<210> 201	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 201	
	auggccucua aaaacauggc ccc	23

	<210> 202	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
5		
	<400> 202	
	auggccucua aaaacauggc ccc	23
	<210> 203	
10	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 203	
15	uuuuuuuucu ucaggcagga aga	23
	<210> 204	
	<211> 23	
	<212> ARN	
20	<213> Homo sapiens	
	<400> 204	
	uuuuuuuucu ucaggcagga aga	23
25	<210> 205	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 205	
	cuaugcacg gccuuggaga gcu	23
	<210> 206	
	<211> 23	
35	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 206	
	cuuau ^g cac ^g gccu ^g gaga gcu	23
5	<210> 207	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 207	
	uau ^g cac ^g gc cu ^g gagagc uuc	23
	<210> 208	
	<211> 23	
	<212> ARN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 208	
	uau ^g cac ^g gc cu ^g gagagc uuc	23
20	<210> 209	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 209	
	uga ^a auucag gcc ^c uccagg auu	23
	<210> 210	
	<211> 23	
30	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 210	
	uga ^a auucag gcc ^c uccagg auu	23
35	<210> 211	
	<211> 23	

	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 211	
5	ucugucaagc uccuugacca aa	23
	<210> 212	
	<211> 23	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 212	
	ucugucaagc uccuugacca aa	23
15	<210> 213	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 213	
	cugucaagcu ccuugaccaa auc	23
	<210> 214	
	<211> 23	
25	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 214	
	cugucaagcu ccuugaccaa auc	23
30	<210> 215	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 215	
	uguagcgaug cucacugggg aga	23

<210> 216
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 216
 uguagcgaug cucacugggg aga 23
 <210> 217
 10 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 217
 guccaacagc accaauaucu u 21
 20
 <210> 218
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 30 <400> 218
 guccaacagc accaauaucu u 21
 <210> 219
 <211> 21
 35 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

5 <400> 219
 uaaugauuga acaaaauacc a 21

<210> 220
 <211> 21

10 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 220
 uaaugauuga acaaaauacc a 21

20 <210> 221
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 221

30 cuucuuuauug auugaacaaa a 21

<210> 222
 <211> 21
 <212> ARN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 222

5 cuucuuaaug auugaacaaa a 21

<210> 223

<211> 21

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <400> 223

auugaacaaa auaccaaguc u 21

<210> 224

20 <211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 224

30 auugaacaaa auaccaaguc u 21

<210> 225

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 225

uucuuaauga uugaacaaaa u 21

5

<210> 226

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15

<400> 226

uucuuaauga uugaacaaaa u 21

<210> 227

<211> 21

20

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 227

caaaccuuu gucuucuua u 21

30

<210> 228

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 228
 caaacccuuu gucuucuuaa u 21

5 <210> 229
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <400> 229
 ugucuucuua augauugaac a 21

20 <210> 230
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <400> 230
 ugucuucuua augauugaac a 21

35 <210> 231
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 231

caccuggaaa augaacucac c 21

<210> 232
<211> 21
5 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 232
caccuggaaa augaacucac c 21

15 <210> 233
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 233
25 uuuugcucug gugaauuaca u 21

<210> 234
<211> 21
<212> ARN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

35 <400> 234
uuuugcucug gugaauuaca u 21

<210> 235
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 10
 <400> 235
 acccuuuguc uucuuaauga u 21
 <210> 236
 <211> 21
 15
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 20
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 236
 acccuuuguc uucuuaauga u 21
 25
 <210> 237
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 237
 35
 uugaacaaaa uaccaagucu c 21
 <210> 238

<211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 238
 10 uugaacaaaa uaccaagucu c 21

<210> 239
 <211> 21
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 20

<400> 239
 guucaacaaa cccuuugucu u 21

<210> 240
 25 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 240
 guucaacaaa cccuuugucu u 21
 35

<210> 241
 <211> 21

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 241
 aaauaccaag ucuccccucu u 21

10 <210> 242
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

20 <400> 242
 aaauaccaag ucuccccucu u 21

<210> 243
 <211> 21

25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 243
 uuuuugcucu ggugaauuac a 21

35 <210> 244
 <211> 21
 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 244

uuuuugcucu ggugaauuac a 21

10 <210> 245

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 245

20 aguucaacaa acccuuguc u 21

<210> 246

<211> 21

<212> ARN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <400> 246

aguucaacaa acccuuguc u 21

<210> 247

35 <211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

5 <400> 247
 aaugauugaa caaaauacca a 21

<210> 248
 <211> 21
 10 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 248
 aaugauugaa caaaauacca a 21

20 <210> 249
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 249
 30 uacuggaacc uaugaucuga a 21

<210> 250
 <211> 21
 <212> ARN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 250
 5 uacuggaacc uaugaucuga a 21

<210> 251
 <211> 21
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <400> 251
 acauuaaaga agguugagc u 21

<210> 252
 20 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 252
 acauuaaaga agguugagc u 21

30 <210> 253
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 253

aaaauugugg auuuggucaa g 21

5

<210> 254

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15

<400> 254

aaaauugugg auuuggucaa g 21

<210> 255

<211> 21

20

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 255

auuacuggaa ccuaugaucu g 21

30

<210> 256

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 256
 auuacuggaa ccuaugaucu g 21

5 <210> 257
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <400> 257
 cacaguuuuu gcucugguga a 21

20 <210> 258
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <400> 258
 cacaguuuuu gcucugguga a 21

35 <210> 259
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 259

uuaaagaagg guugagcugg u 21

<210> 260

<211> 21

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 260

uuaaagaagg guugagcugg u 21

15 <210> 261

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 261

25 agugagcauc gcuacagccu u 21

<210> 262

<211> 21

<212> ARN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

35 <400> 262

agugagcauc gcuacagccu u 21

<210> 263
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 10 <400> 263
 aaggagcuug acagagacac a 21
 <210> 264
 <211> 21
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 264
 aaggagcuug acagagacac a 21
 25 <210> 265
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 265
 35 guggauaagu uuuuggagga u 21
 <210> 266

<211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 266
 10 guggauaagu uuuggagga u 21

<210> 267
 <211> 21
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 20

<400> 267
 gauugaacaa aaaccaagu c 21

<210> 268
 25 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 268
 gauugaacaa aaaccaagu c 21
 35

<210> 269
 <211> 21

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 269
 gcucuccaag gccgugcaua a 21
 10

<210> 270
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 270
 gcucuccaag gccgugcaua a 21
 20

<210> 271
 <211> 21
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 271
 accuggaaaa ugaacucacc c 21

<210> 272
 <211> 21
 35 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 272

accuggaaaa ugaacucacc c 21

10 <210> 273

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 273

20 gggaccaagg cugacacuca c 21

<210> 274

<211> 21

<212> ARN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <400> 274

gggaccaagg cugacacuca c21

<210> 275

35 <211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

5 <400> 275
 gccauguuuu uagaggccau a 21

<210> 276
 <211> 21
 10 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 276
 gccauguuuu uagaggccau a 21

20 <210> 277
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 277
 30 ccuggaaaau gaacucaccc a 21

<210> 278
 <211> 21
 <212> ARN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 278

5 ccuggaaaau gaacucaccc a 21

<210> 279

<211> 21

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <400> 279

aagaggccaa gaaacagauc a 21

<210> 280

20 <211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 280

30 aagaggccaa gaaacagauc a 21

<210> 281

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 281

ggcaaauggg agagaccuu u 21

5

<210> 282

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15

<400> 282

ggcaaauggg agagaccuu u 21

<210> 283

<211> 21

20

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 283

ugggaaaagu ggugaaucc a 21

30

<210> 284

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 284
 ugggaaaagu ggugaauccc a 21

<210> 285
 5 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 285
 ggggaccaag gcugacacuc a 21
 15

<210> 286
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 286
 ggggaccaag gcugacacuc a 21
 25

<210> 287
 <211> 21
 30 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 35 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 287

gacauaaaag aagguugag c 21

<210> 288
<211> 21
5 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 288
gacauaaaag aagguugag c 21

15 <210> 289
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 289
25 ggccauguuu uuagaggcca u 21

<210> 290
<211> 21
<212> ARN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

35 <400> 290
ggccauguuu uuagaggcca u 21

<210> 291
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 10
 <400> 291
 uuccugccug augaggggaa a 21
 <210> 292
 <211> 21
 15
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 20
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 292
 uuccugccug augaggggaa a 21
 25
 <210> 293
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 293
 35
 cucuccaagg ccgugcauaa g 21
 <210> 294

<211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 294
 10 cucuccaagg ccgugcauaa g 21

<210> 295
 <211> 21
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 20

<400> 295
 agcucuccaa ggccgugcau a 21

<210> 296
 25 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 296
 agcucuccaa ggccgugcau a 21
 35

<210> 297
 <211> 21

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 297
 uccuggaggg ccugaauuuc a 21
 10

<210> 298
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 298
 uccuggaggg ccugaauuuc a 21
 20

<210> 299
 <211> 21
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 299
 uuggucaagg agcuugacag a 21

<210> 300
 <211> 21
 35 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 300

uuggucaagg agcuugacag a 21

10 <210> 301

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 301

20 uuuggucaag gagcuugaca g 21

<210> 302

<211> 21

<212> ARN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <400> 302

uuuggucaag gagcuugaca g 21

<210> 303

35 <211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

5 <400> 303
 uccccaguga gcaucgcuac a 21

<210> 304
 <211> 21

10 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 304
 uccccaguga gcaucgcuac a 21

20 <210> 305
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 305

30 aagauauugg ugcuguugga cug 23

<210> 306
 <211> 23
 <212> ARN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 306

5 aagauauugg ugcuguugga cug 23

<210> 307

<211> 23

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15

<400> 307

ugguauuuug uucaaucuu aag 23

<210> 308

20

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 308

ugguauuuug uucaaucuu aag 23

30

<210> 309

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 309

uuuuguucaa ucauuuagaa gac 23

5

<210> 310

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15

<400> 310

uuuuguucaa ucauuuagaa gac 23

<210> 311

<211> 23

20

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 311

agacuuggua uuuuguucaa uca 23

30

<210> 312

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 312
agacuuggua uuuuguucaa uca 23

5 <210> 313
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <400> 313
auuuuguuca aucauuuaga aga 23

20 <210> 314
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <400> 314
auuuuguuca aucauuuaga aga 23

35 <210> 315
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 315

auuaagaaga caaaggguuu guu 23

<210> 316
<211> 23
5 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 316
auuaagaaga caaaggguuu guu 23

15 <210> 317
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 317
25 uguucaauca uuaagaagac aaa 23

<210> 318
<211> 23
<212> ARN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

35 <400> 318
uguucaauca uuaagaagac aaa 23

<210> 319
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 10
 <400> 319
 ggugaguuca uuuccaggu gcu 23
 <210> 320
 <211> 23
 15
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 20
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 320
 ggugaguuca uuuccaggu gcu 23
 25
 <210> 321
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 321
 35
 auguaauuca ccagagcaaa aac 23
 <210> 322

<211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 322
 10 auguaauuca ccagagcaaa aac 23

<210> 323
 <211> 23
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

20

<400> 323
 aucauuuaga agacaaaggg uuu 23

<210> 324
 25 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 324
 aucauuuaga agacaaaggg uuu 23

35

<210> 325
 <211> 23

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 325
 gagacuuggu auuuuguuca auc 23
 10

<210> 326
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 326
 gagacuuggu auuuuguuca auc 23
 20

<210> 327
 <211> 23
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 327
 aagacaaagg guuuguugaa cuu 23

<210> 328
 <211> 23
 35 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 328

aagacaaagg guuuguugaa cuu 23

10 <210> 329

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 329

20 aagaggggag acuugguauu uug 23

<210> 330

<211> 23

<212> ARN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <400> 330

aagaggggag acuugguauu uug 23

<210> 331

35 <211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

5

<400> 331

uguaauucac cagagcaaaa acu 23

<210> 332

<211> 23

10

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

15

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 332

uguaauucac cagagcaaaa acu 23

20

<210> 333

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 333

30

agacaaaggg uuuguugaac uug 23

<210> 334

<211> 23

<212> ARN

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 334
 5 agacaaaggg uuuguugaac uug 23

<210> 335
 <211> 23
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <400> 335
 uugguauuuu guucaaucu uaa 23

<210> 336
 20 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 336
 30 uugguauuuu guucaaucu uaa 23

<210> 337
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 337

uucagaucau agguuccagu aau 23

5

<210> 338

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15

<400> 338

uucagaucau agguuccagu aau 23

<210> 339

<211> 23

20

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 339

agcucaaccc uucuuuaug uca 23

30

<210> 340

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 340
 agcucaaccc uucuuuaaug uca 23

5 <210> 341
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <400> 341
 cuugaccaa uccacaauuu ucc 23

20 <210> 342
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <400> 342
 cuugaccaa uccacaauuu ucc 23

35 <210> 343
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 343

cagaucauag guuccaguaa ugg 23

<210> 344
<211> 23
5 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 344
cagaucauag guuccaguaa ugg 23

15 <210> 345
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 345
25 uuccaccagag caaaaacugu guc 23

<210> 346
<211> 23
<212> ARN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

35 <400> 346
uuccaccagag caaaaacugu guc 23

<210> 347
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 10
 <400> 347
 accagcucaa cccuucuuua aug 23
 <210> 348
 <211> 23
 15
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 20
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 348
 accagcucaa cccuucuuua aug 23
 25
 <210> 349
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 349
 35
 aaggcuguag cgaugcucac ugg 23
 <210> 350

<211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 350
 10 aaggcuguag cgaugcucac ugg 23

<210> 351
 <211> 23
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 20

<400> 351
 ugugucucug ucaagcuccu uga 23

<210> 352
 25 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 352
 ugugucucug ucaagcuccu uga 23
 35

<210> 353
 <211> 23

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 353
 auccuccaaa aacuuaucca cua 23

10 <210> 354
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

20 <400> 354
 auccuccaaa aacuuaucca cua 23

<210> 355
 <211> 23

25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 355
 gacuugguau uuuguucau cau 23

35 <210> 356
 <211> 23
 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 356

gacuugguau uuuguucaau cau 23

10 <210> 357

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 357

20 uuaugcacgg ccuuggagag cuu 23

<210> 358

<211> 23

<212> ARN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <400> 358

uuaugcacgg ccuuggagag cuu 23

<210> 359

35 <211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

5 <400> 359
 gggugaguuc auuuuccagg ugc 23

<210> 360
 <211> 23
 10 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 360
 gggugaguuc auuuuccagg ugc 23

20 <210> 361
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 361
 30 gugaguguca gccuuggucc cca 23

<210> 362
 <211> 23
 <212> ARN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 362
 5 gugaguguca gccuuggucc cca 23

<210> 363
 <211> 23
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <400> 363
 uauggccucu aaaaacaugg ccc 23

<210> 364
 20 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 364
 30 uauggccucu aaaaacaugg ccc 23

<210> 365
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 35

<220>
 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 365

ugggugaguu cauuuuccag gug 23

5

<210> 366

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15

<400> 366

ugggugaguu cauuuuccag gug 23

<210> 367

<211> 23

20

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 367

ugaucuguuu cuuggccucu ucg 23

30

<210> 368

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 368
 ugaucuguuu cuuggccucu ucg 23

<210> 369
 5 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 369
 aaagggucuc ucccauuugc cuu 23
 15

<210> 370
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 370
 aaagggucuc ucccauuugc cuu 23
 25

<210> 371
 <211> 23
 30 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 35 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 371

ugggauucac cacuuuuccc aug 23

<210> 372
 <211> 23
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 372
 ugggauucac cacuuuuccc aug 23

15 <210> 373
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 373
 25 ugagugucag ccuugguccc cag 23

<210> 374
 <211> 23
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

35 <400> 374
 ugagugucag ccuugguccc cag 23

<210> 375
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 10
 <400> 375
 gcucaacccu ucuuuuauugu cau 23
 <210> 376
 <211> 23
 15
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 20
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 376
 gcucaacccu ucuuuuauugu cau 23
 25
 <210> 377
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 377
 35
 auggccucua aaaacauggc ccc 23
 <210> 378

<211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 378
 10 auggccucua aaaacauggc ccc 23

<210> 379
 <211> 23
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 20

<400> 379
 uuuccccuca ucaggcagga aga 23

<210> 380
 25 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 380
 uuuccccuca ucaggcagga aga 23
 35

<210> 381
 <211> 23

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 381
 cuuau^gcac^g gccu^ggaga gcu 23

10 <210> 382
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

20 <400> 382
 cuuau^gcac^g gccu^ggaga gcu 23

<210> 383
 <211> 23

25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 383
 uau^gcac^ggc cu^ggagagc uuc 23

35 <210> 384
 <211> 23
 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 384

uaugcacggc cuuggagagc uuc 23

10 <210> 385

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 385

20 ugaaauucag gccuccagg auu 23

<210> 386

<211> 23

<212> ARN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <400> 386

ugaaauucag gccuccagg auu 23

<210> 387

35 <211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

5 <400> 387
 ucugucaagc uccuugacca aaau 23

<210> 388
 <211> 23

10 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 388
 ucugucaagc uccuugacca aaau 23

20 <210> 389
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 389

30 cugucaagcu ccuugaccaa auc 23

<210> 390
 <211> 23
 <212> ARN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 390
 5 cugucaagcu ccuugaccaa auc 23

<210> 391
 <211> 23
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <400> 391
 uguagcgaug cucacugggg aga 23

<210> 392
 20 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 392
 uguagcgaug cucacugggg aga 23

30 <210> 393
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 393

guccaacagc accaauaucu u 21

5

<210> 394

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

15

<400> 394

aagauauugg ugcuguugga cug 23

<210> 395

<211> 21

20

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 395

guccaacagc accaauaucu u 21

30

<210> 396

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 396
aagauauugg ugcuguugga cug 23

<210> 397
5 <211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 397
15 guccaacagc accaauaucu u 21

<210> 398
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
20

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 398
25 aagauauugg ugcuguugga cug 23

<210> 399
<211> 21
30 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
35 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 399

guccaacagc accaauaucu u 21

<210> 400
<211> 23
5 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 400
aagauauugg ugcuguugga cug 23

15 <210> 401
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 401
25 cuucuaaug auugaacaaa a 21

<210> 402
<211> 21
<212> ARN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

35 <400> 402
cuucuaaug auugacaaa a 21

<210> 403
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 10
 <400> 403
 cuucuuuauug auugaucaaa a 21
 <210> 404
 <211> 21
 15
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 20
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 404
 cuucuuuauug auugagcaaa a 21
 25
 <210> 405
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 405
 35
 cuucuuuauug auugaccaaa a 21
 <210> 406

<211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 406
 10 cuucuuaaug auugaccaa a 21

<210> 407
 <211> 21
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 20

<400> 407
 cuucuuaaug auugaacaaa a 21

<210> 408
 25 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 408
 cuucuuaaug auugaacaaa a 21
 35

<210> 409
 <211> 23

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 409
 uuuuguucaa ucauuuagaa gac 23
 10

<210> 410
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 410
 uuuuggucaa ucauuuagaa gac 23
 20

<210> 411
 <211> 23
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 411
 uuuugaucaa ucauuuagaa gac 23

<210> 412
 <211> 23
 35 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 412

uuuugcucaa ucauuuagaa gac 23

10 <210> 413

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<220>

20 <221> base_modificada

<222> (6)..(6)

<223> Inosina

<400> 413

25 uuuugnucaa ucauuuagaa gac 23

<210> 414

<211> 23

<212> ARN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

35 <220>

<221> base_modificada

<222> (6)..(6)
 <223> a, c, u o g

 <400> 414
 5 uuuugnucaa ucauuuagaa gac 23

 <210> 415
 <211> 23
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 15

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> a, c, u o g
 20

 <400> 415
 uuuugnucaa ucauuuagaa gac 23

 <210> 416
 25 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

 <220>
 <221> base_modificada
 35 <222> (6)..(6)
 <223> a, c, u o g

<400> 416
uuuugnucaa ucuaaagaa gac 23

<210> 417
5 <211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 417
15 cuucuaaag auugaacaaa a 21

<210> 418
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
20

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

25 <400> 418
cuucuaaag auugaacaaa a 21

<210> 419
<211> 23
30 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
35 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 419

uuuuguucaa ucauuuagaa gac 23

<210> 420
<211> 23
5 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 420
uuuuguucaa ucauuuagaa gac 23

15 <210> 421
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 421
25 cuucuuuauug auugaacaaa a 21

<210> 422
<211> 21
<212> ARN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

35 <400> 422
cuucuuuauug auugacaaa a 21

<210> 423
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 10
 <400> 423
 cuucuuuauug auugaucaaa a 21
 <210> 424
 <211> 21
 15
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 20
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 424
 cuucuuuauug auugagcaaa a 21
 25
 <210> 425
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 425
 35
 cuucuuuauug auugaccaaa a 21
 <210> 426

<211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 426
 10 cuucuuuauug auugaccaa a 21

<210> 427
 <211> 21
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 20

<400> 427
 cuucuuuauug auugaacaaa a 21

<210> 428
 25 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 428
 cuucuuuauug auugaacaaa a 21
 35

<210> 429
 <211> 23

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 429
 uuuuguucaa ucauuuagaa gac 23

10 <210> 430
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

20 <400> 430
 uuuuggucaa ucauuuagaa gac 23

<210> 431
 <211> 23

25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 431
 uuuugaucaa ucauuuagaa gac 23

35 <210> 432
 <211> 23
 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 432

uuuugcucaa ucauuuagaa gac 23

10 <210> 433

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<220>

20 <221> base_modificada

<222> (6)..(6)

<223> Inosina

<400> 433

25 uuuugnucaa ucauuuagaa gac 23

<210> 434

<211> 23

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

35 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético"

<220>

<221> base_modificada

5 <222> (6)..(6)

<223> Desoxirribonucleosina

<400> 434

10 uuuugnucaa ucauuuagaa gac 23

<210> 435

<211> 23

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético"

<220>

25 <221> base_modificada

<222> (6)..(6)

<223> Desoxirribonucleosina

<400> 435

30 uuuugnucaa ucauuuagaa gac 23

<210> 436

<211> 23

<212> ARN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

<220>

5 <221> base_modificada

<222> (6)..(6)

<223> 2-hidroximetil-tetrahidrofurano-4-metoxi-3-fosfato

<400> 436

10 uuuugnucaa ucauuuagaa gac 23

REIVINDICACIONES

1. Un agente de iARN bicatenario para inhibir la expresión de *Serpina1* en una célula, en el que dicho agente de iARN bicatenario comprende una hebra codificante y una hebra no codificante que forman una región bicatenaria,
 en el que dicha hebra codificante comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, o SEQ ID NO: 11, y dicha hebra no codificante comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que se diferencian en no más de 3 nucleótidos de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, o SEQ ID NO: 25,
 en el que sustancialmente todos los nucleótidos de dicha hebra codificante comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación de 2'-O-metilo y una modificación de 2'-flúor,
 en el que dicha hebra codificante comprende dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5',
 en el que sustancialmente todos los nucleótidos de dicha hebra no codificante comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en una modificación de 2'-O-metilo y una modificación de 2'-flúor,
 en el que dicha hebra no codificante comprende dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5' y dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 3',
 en el que dicha hebra codificante está conjugada con uno o más derivados de GalNAc unidos mediante un conector bivalente o trivalente ramificado en el extremo 3', en el que "sustancialmente todos" de los nucleótidos que están modificados significa que no más de 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos están sin modificar.
2. El agente de iARN bicatenario de la reivindicación 1, en el que una de las 3 diferencias de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la hebra no codificante es un desapareamiento de nucleótido en la región semilla de la hebra no codificante.
3. El agente de iARN bicatenario de la reivindicación 2, en el que la hebra no codificante comprende una base universal en el nucleótido desapareado.
4. El agente de iARN bicatenario de la reivindicación 1, en el que todos los nucleótidos de dicha hebra codificante y todos los nucleótidos de dicha hebra no codificante comprenden una modificación.
5. Una célula *in vitro* que contiene el agente de iARN bicatenario de la reivindicación 1.
6. Una composición farmacéutica que comprende el agente de iARN bicatenario de la reivindicación 1.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en el que agente de iARN va a administrarse
 (a) en una disolución no tamponada,
 en el que dicha disolución no tamponada es preferentemente solución salina o agua; o
 (b) con una disolución de tampón,
 en el que dicha disolución de tampón comprende preferentemente acetato, citrato, prolamina, carbonato, o fosfato o cualquier combinación de los mismos, en la que es particularmente preferido que dicha disolución de tampón sea solución salina tamponada con fosfato (PBS).
8. Un método de inhibición de la expresión de *Serpina1* en una célula, comprendiendo el método:
 (a) poner en contacto la célula con el agente de iARN bicatenario de la reivindicación 1 o la composición farmacéutica de la reivindicación 6 o 7; y
 (b) mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm de un gen *Serpina1*, inhibiéndose así la expresión del gen *Serpina1* en la célula,
 en el que se excluyen métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.
9. El método de la reivindicación 8, en el que la expresión de *Serpina1* se inhibe al menos aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 100 %.

10. El agente de iARN bicatenario de la reivindicación 1, o la composición farmacéutica de la reivindicación 6 o 7 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad asociada a Serpina1.
11. Un agente de iARN bicatenario de la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de la reivindicación 6 o 7 para su uso en un método de reducción de la acumulación de Serpina1 erróneamente plegada en el hígado de un sujeto que tiene una variante de deficiencia de Serpina1.
12. El agente de iARN o composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 11, en el que dicho agente de iARN o dicha composición farmacéutica van a administrarse por vía subcutánea.
13. El agente de iARN o composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 12, en el que
 - (a) una de las 3 diferencias de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la hebra no codificante es un desapareamiento de nucleótido en la región semilla de la hebra no codificante,
 - en el que preferentemente la hebra no codificante comprende una base universal en el nucleótido desapareado; y/o
 - (b) todos los nucleótidos de dicha hebra codificante y todos los nucleótidos de dicha hebra no codificante comprenden una modificación.
14. El agente de iARN o composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el sujeto es un primate, roedor, o ser humano.
15. El agente de iARN o composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que el agente de iARN bicatenario va a administrarse a una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, preferentemente a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg.
16. El agente de iARN o composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 15, en el que dicho agente de iARN va a administrarse
 - (a) en dos o más dosis; y/o
 - (b) dos veces por semana, cada dos semanas, o a intervalos seleccionados del grupo que consiste en una vez cada aproximadamente 12 horas, una vez cada aproximadamente 24 horas, una vez cada aproximadamente 48 horas, una vez cada aproximadamente 72 horas, y una vez cada aproximadamente 96 horas.
17. El agente de iARN o composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 15, en el que el agente de iARN bicatenario va a administrarse por vía subcutánea o por vía intravenosa.

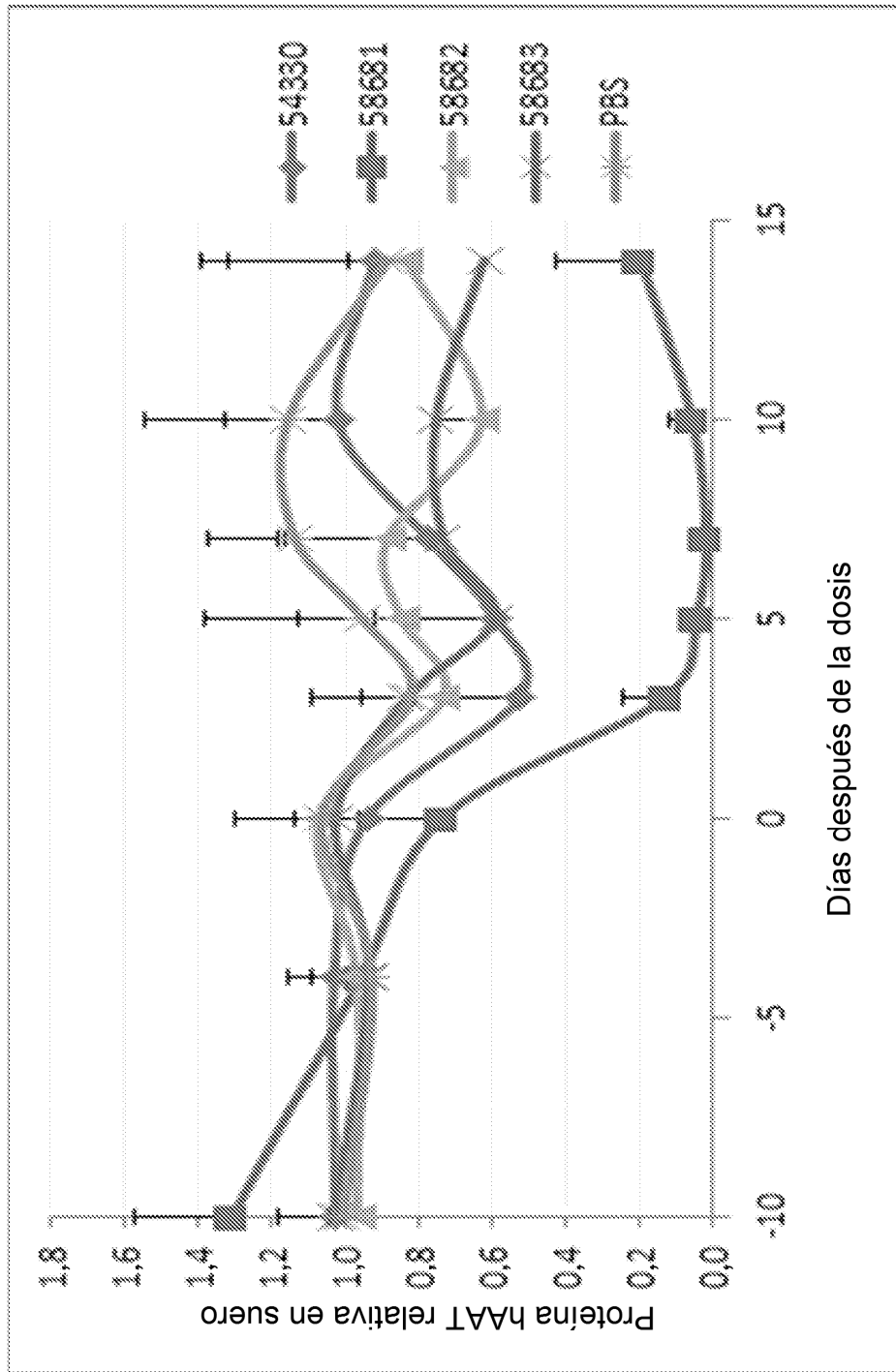


Figura 1

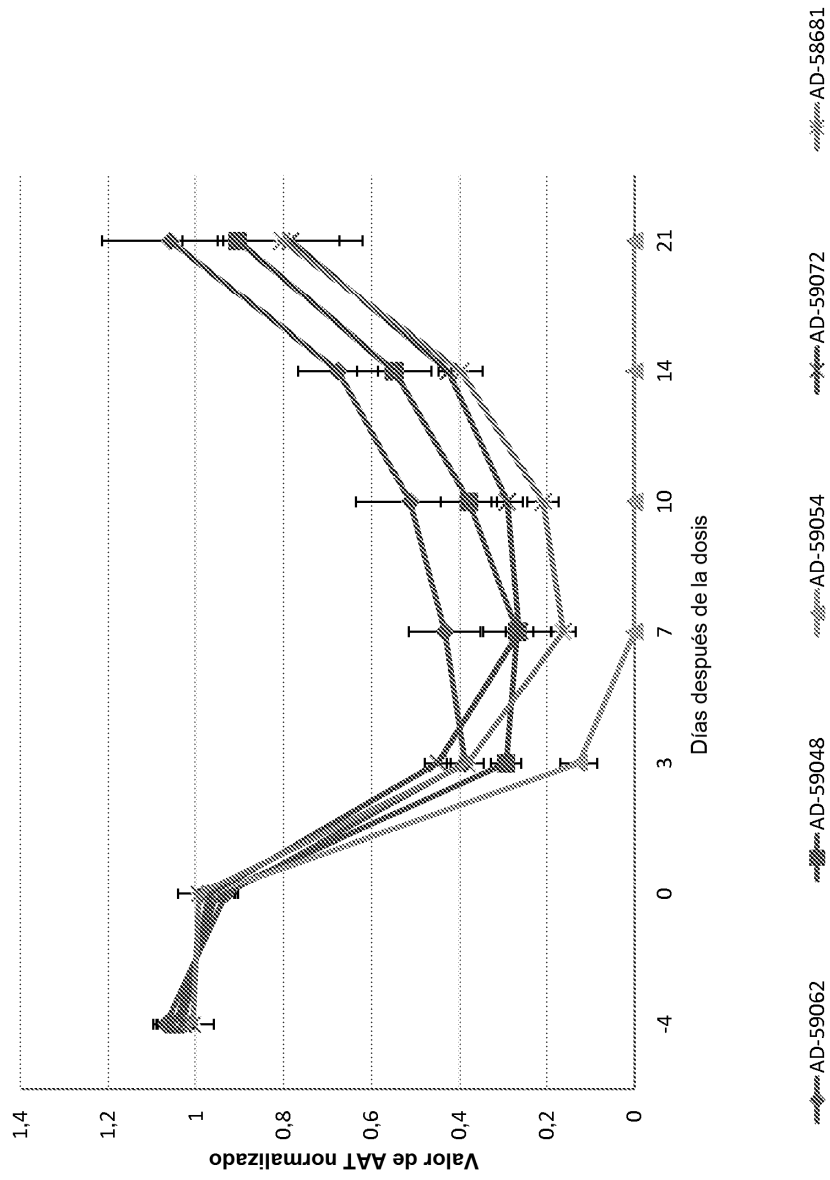


Figura 2A

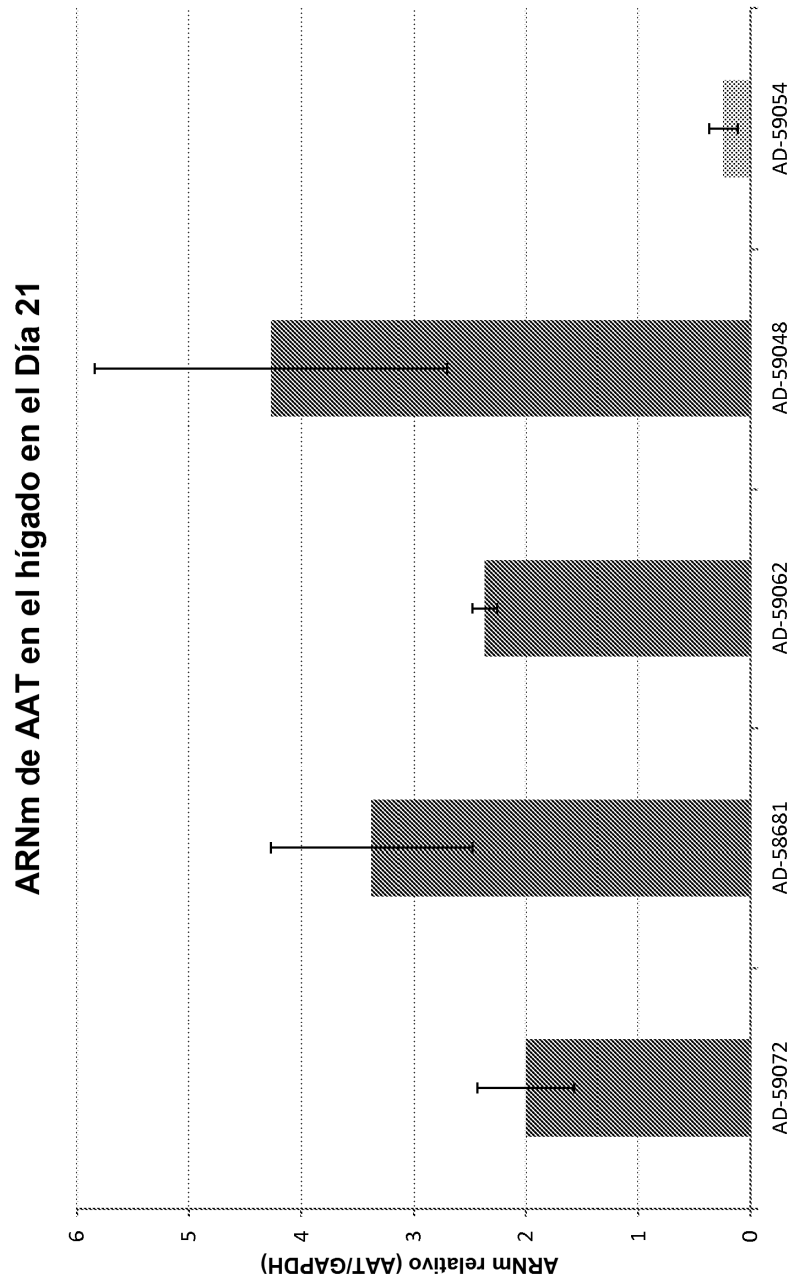


Figura 2B

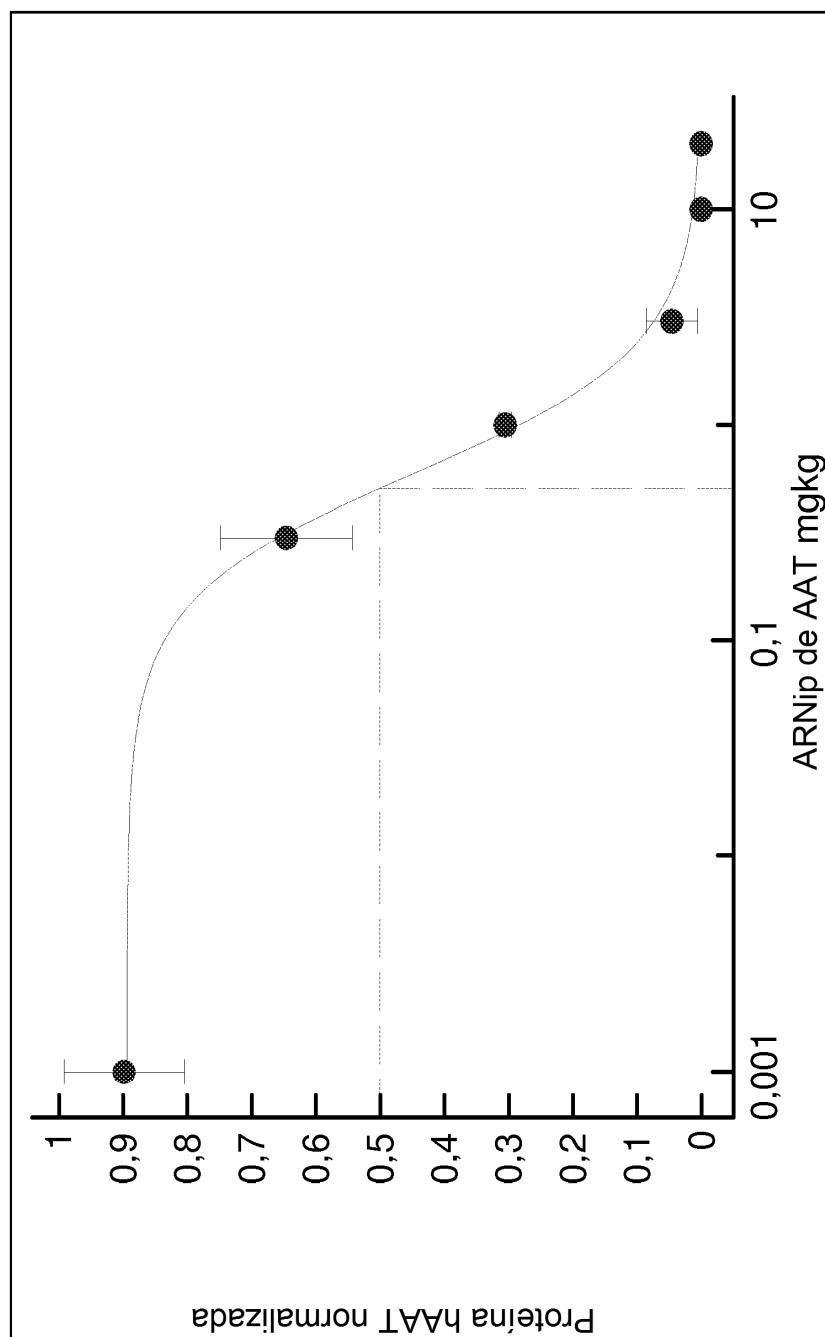


Figura 3A

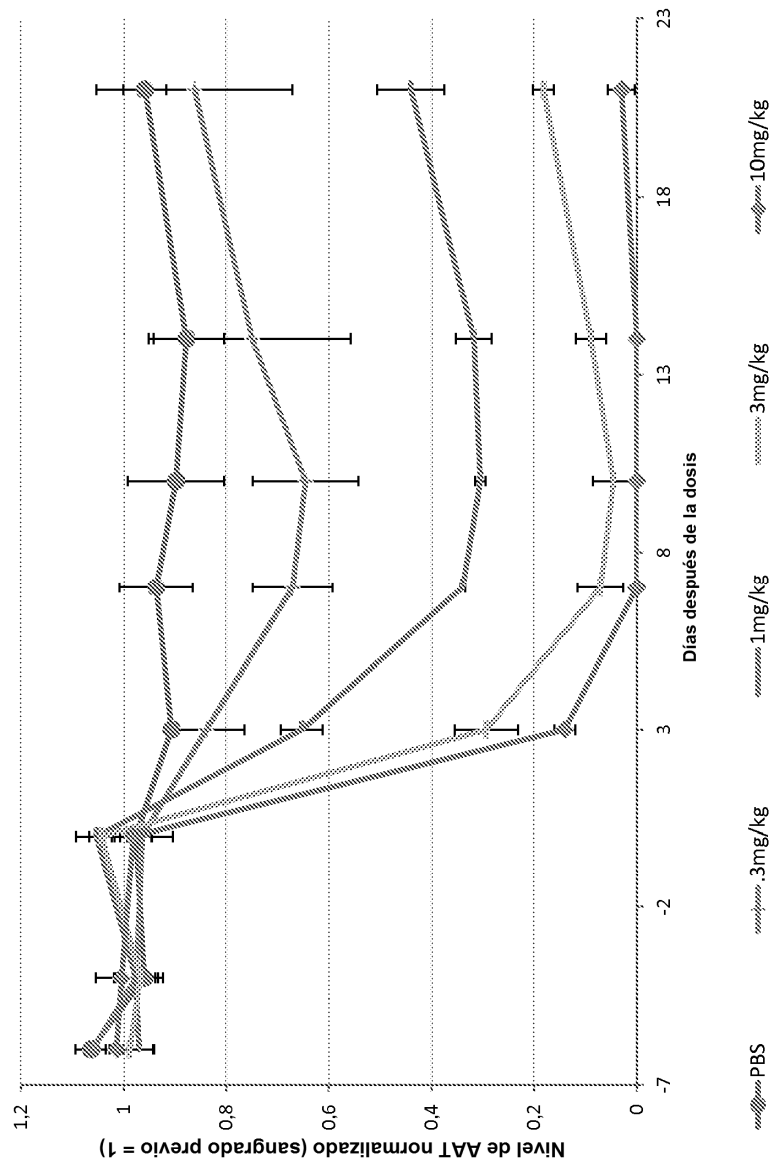


Figura 3B

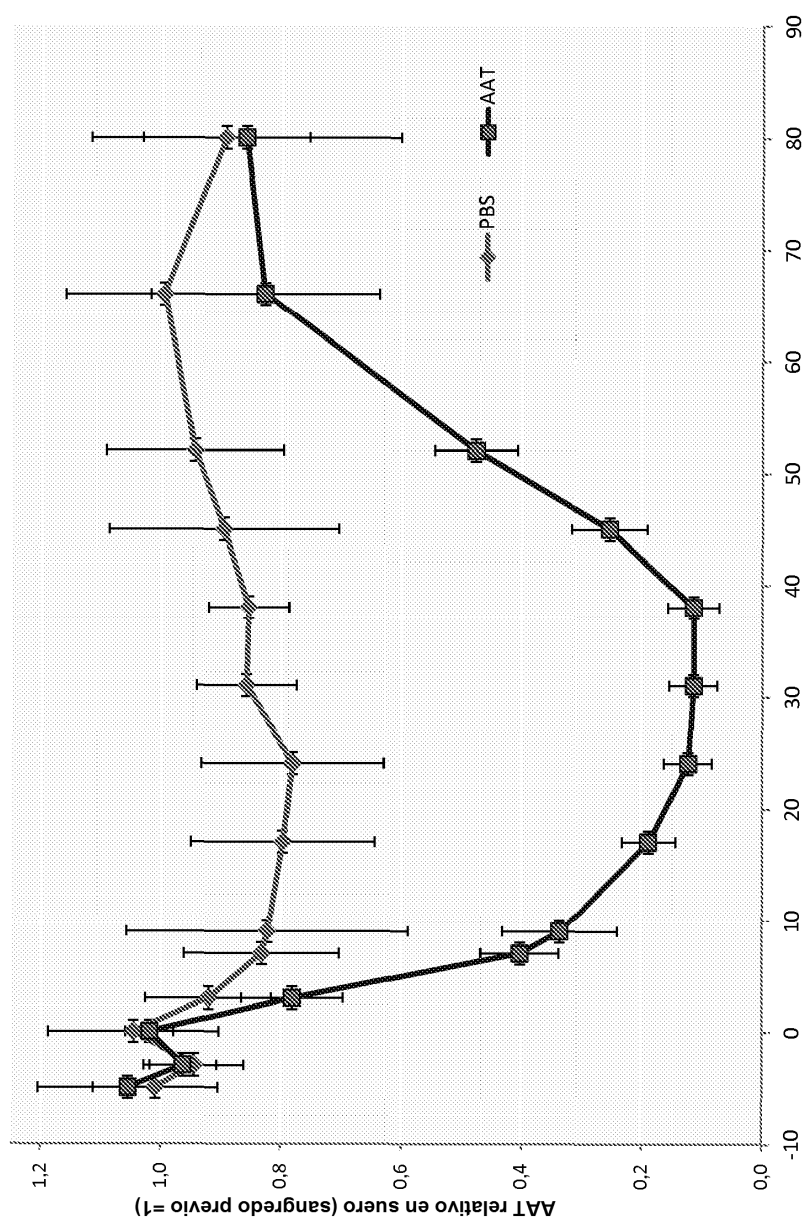


Figura 3C

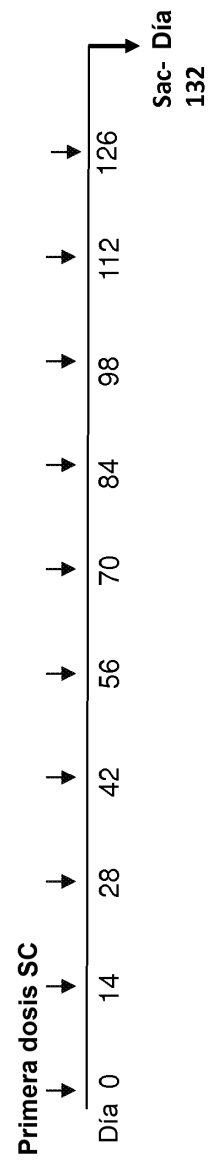


Figura 4A

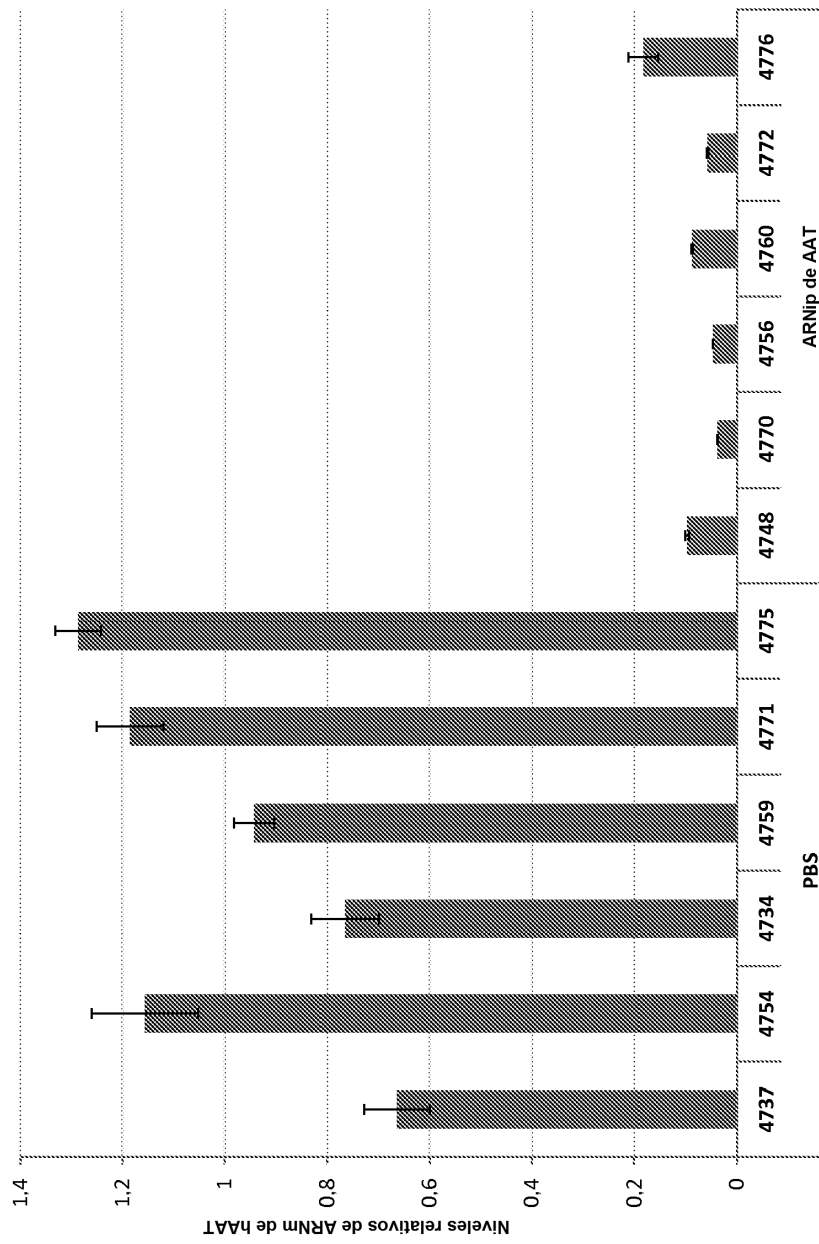


Figura 4B

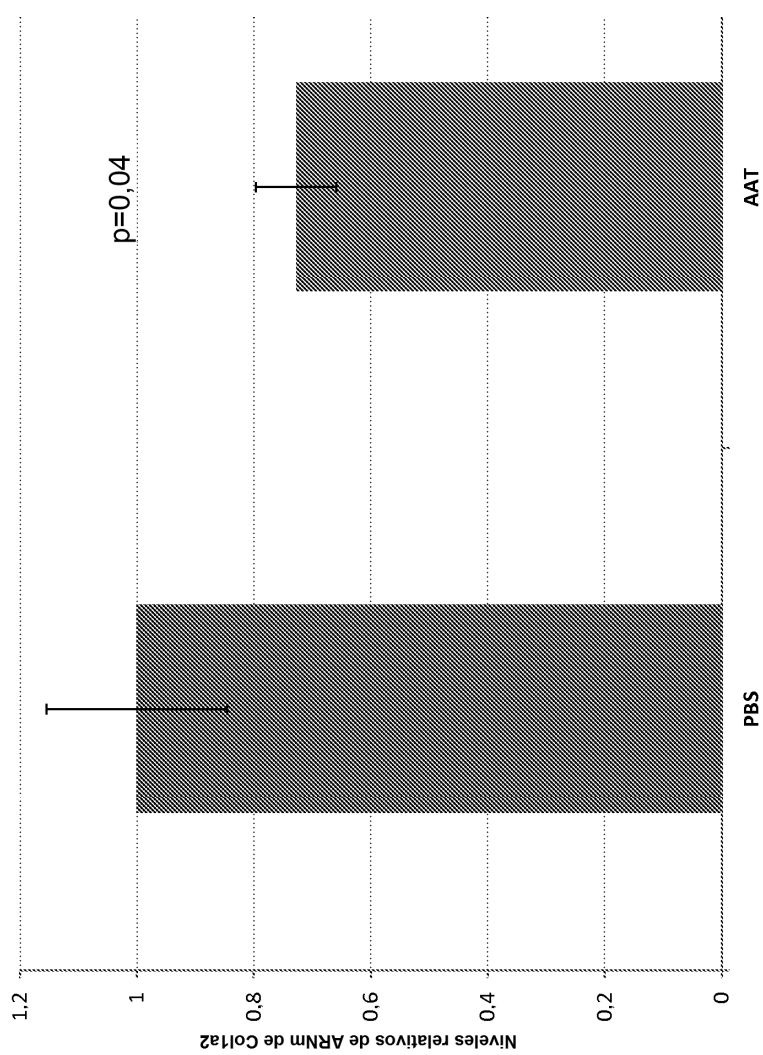


Figura 4C

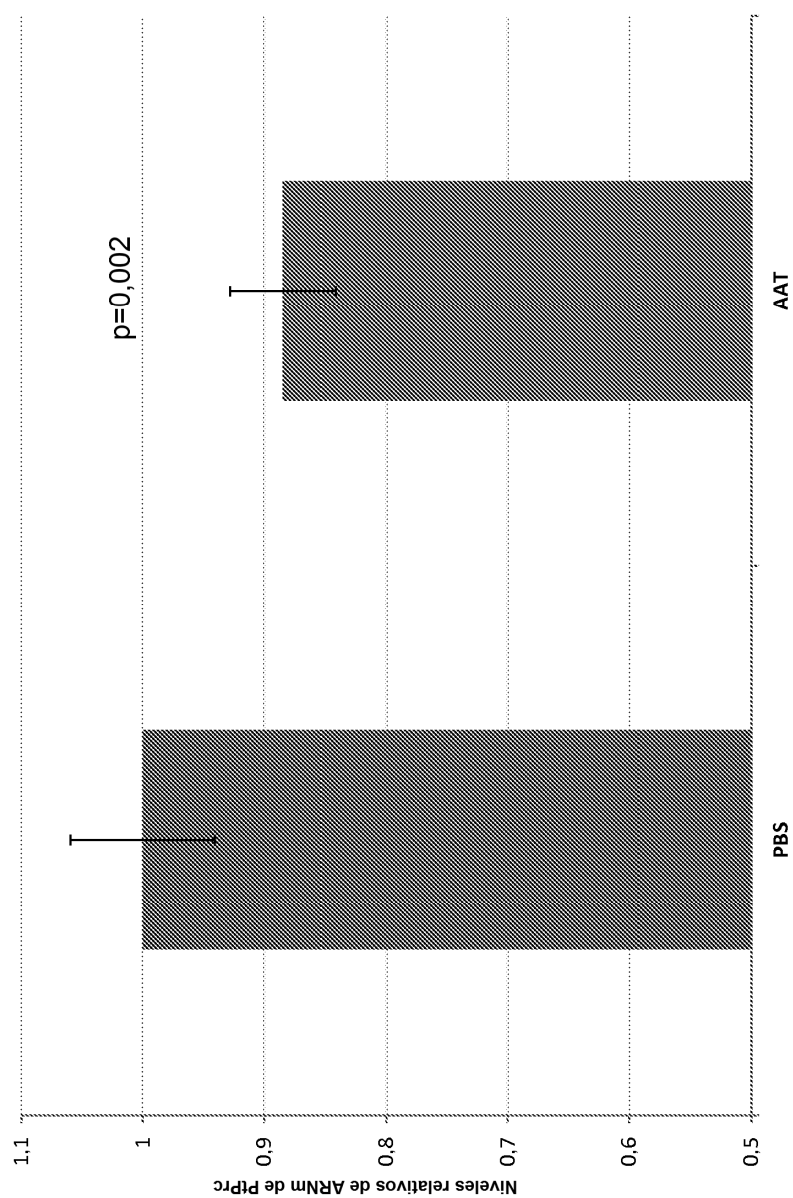


Figura 4D

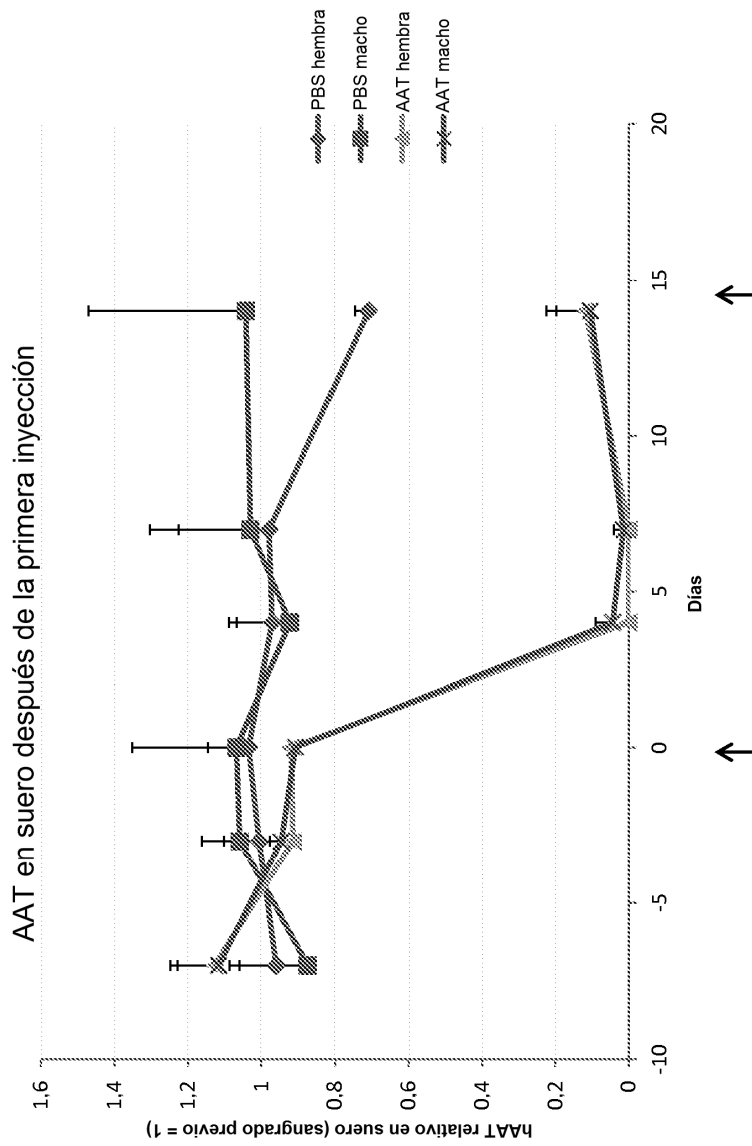


Figura 5A

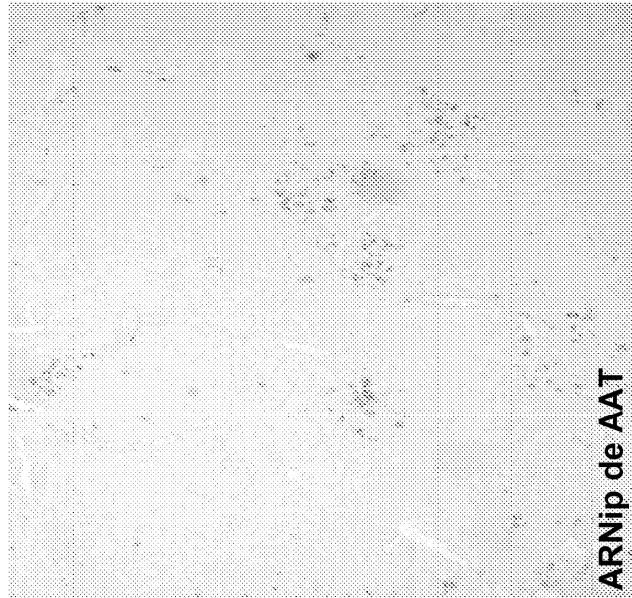


Figura 5C

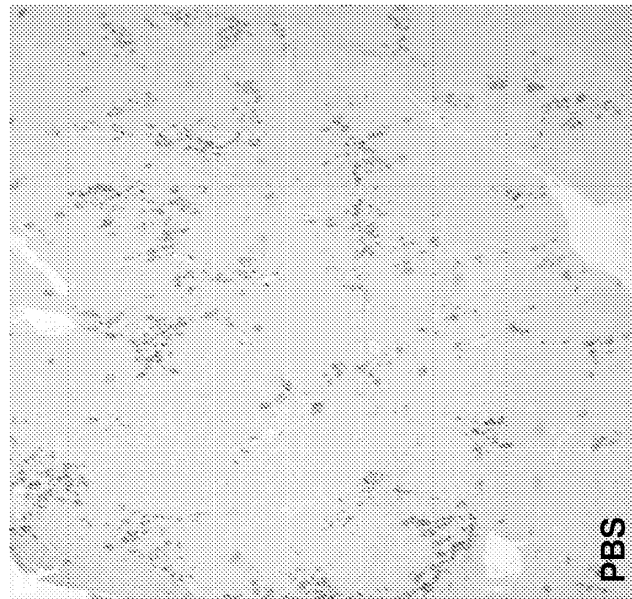


Figura 5B

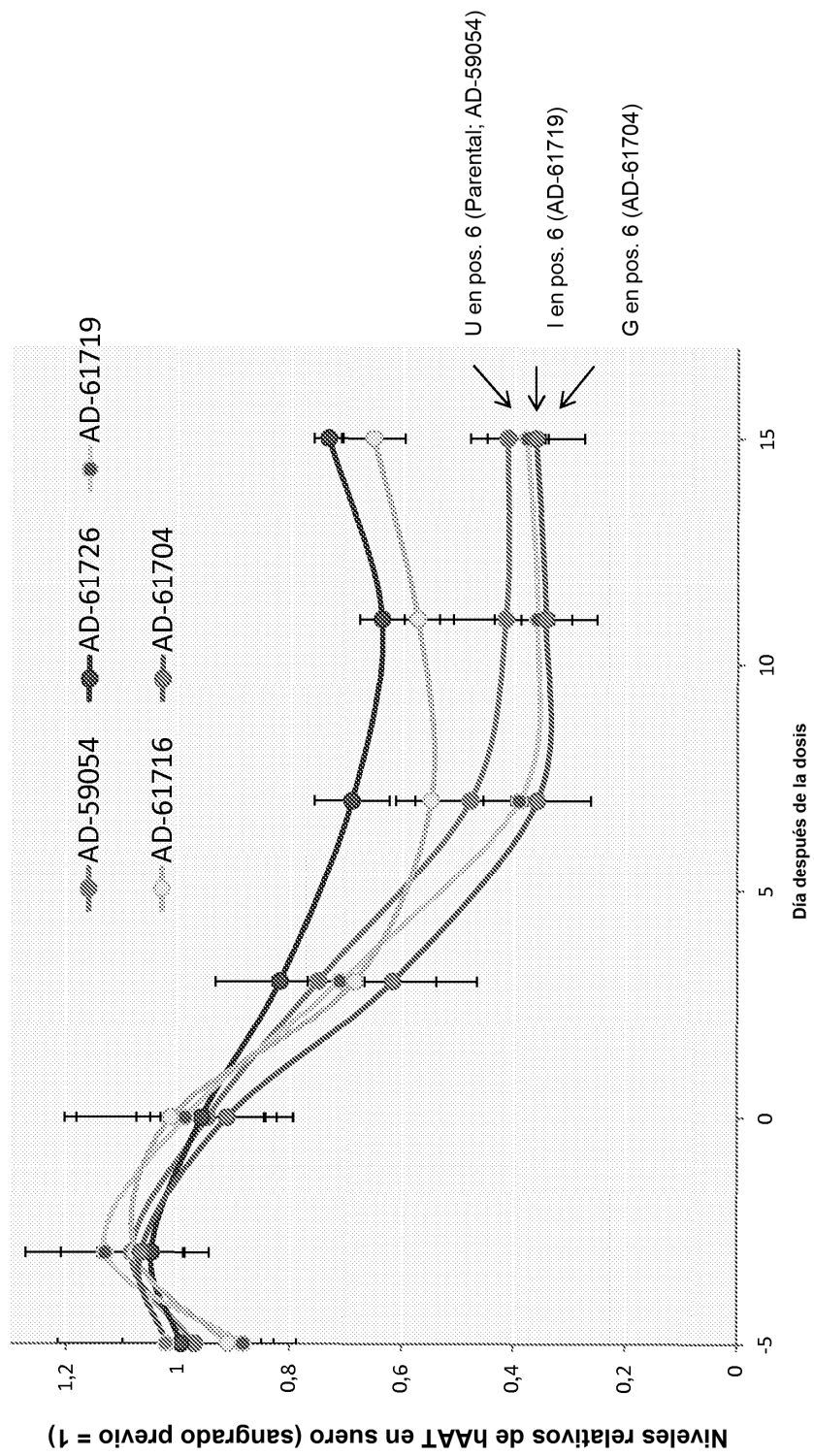


Figura 6

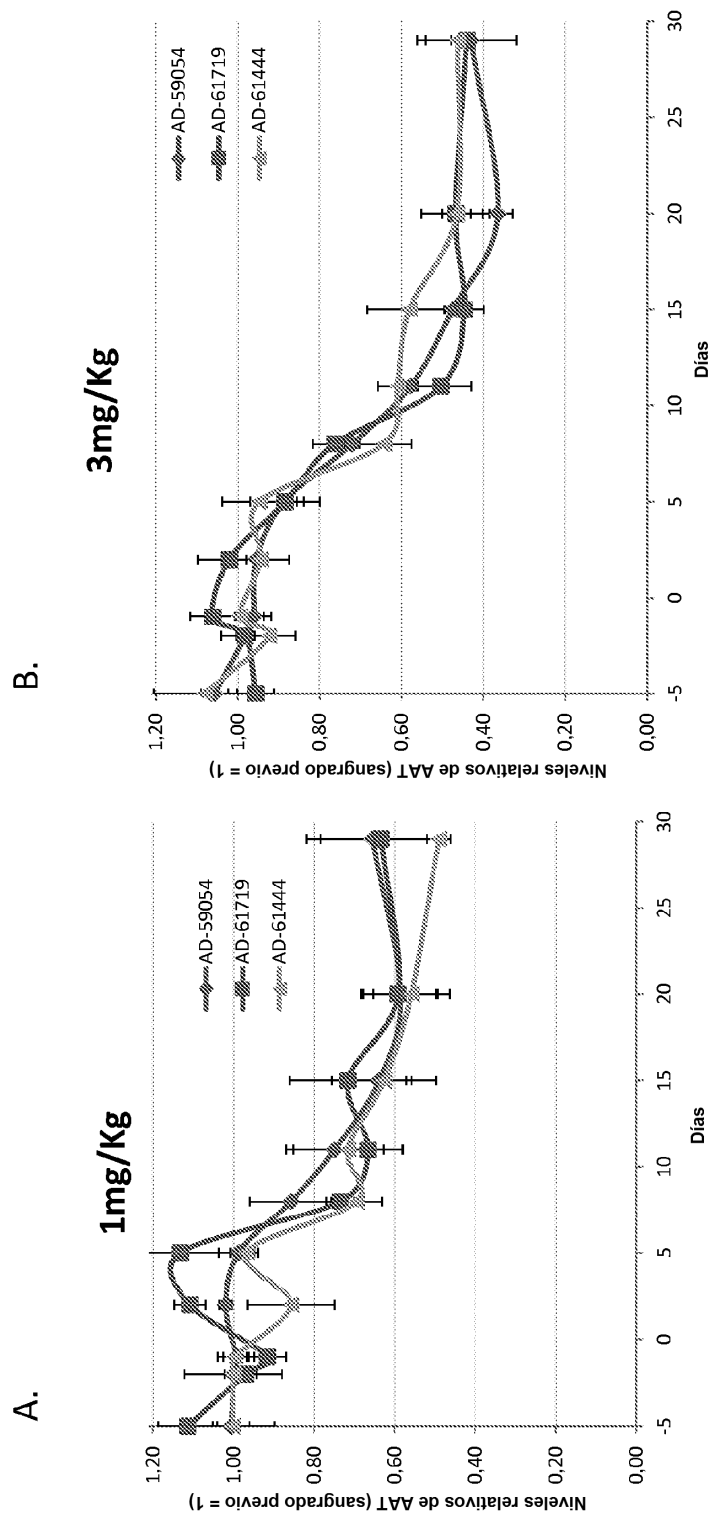


Figura 7

>gi|189163524|ref|NM_000295.4| Inhibidor de serpina peptidasa de Homo sapiens, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 1 (SERPIN1), variante de transcrito 1, ARNm

ACAATGACTCCTTTTCGGTAAGTGCAGTGGAGCTGTACACTGCCCCAGGCAAAGCGTCCGGGCAGCGTAGG
CGGGGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGT
TAATATTACACAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCC
CTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGTCTTCTGTCTCGT
GGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCTGCTCCTTGCTGAGGATCCCCAGGGAGA
TGCTGCCCAGAAGACAGATACATCCACCATGATCAGGATCACCAACCTTCAACAAGATACCCCCAAC
CTGGCTGAGTTCGCCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCACTCCAACAGCACCAATATCTTCTTCT
CCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCAGATGAAAT
CCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTCCAGGAACCTC
CTCCGTACCCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACGGCAATGGCCTGTTCTCAGCGAGG
GCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTGTACCACCTCAGAAGCCTTCACTGTCAA
CTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATT
GTGGATTTGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAGGGA
AATGGGAGAGACCCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAAGTGACACCGT
GAAGGTGCCCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTAATATCCAGCAGTGTGAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTG
CTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCTGATGAGGGGAAACTACAGCAC
TGGAAATGAACCTACCCACGATATCATACCAAGTTCTTGGAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTT
ACATTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATCCT
AAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCAAGAGGAGGACCCCTGAAGCTCTCAAGGCCG
TGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTAGAGGCCAT
ACCCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAATACC
AAGTCTCCCTCTTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAAAATAACTGCCTCTCGCTCTCAACCC
TCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTG
ACTGTAAATCCCTCCCATGTTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCCCTGCTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAGGT
ACAGTGCTGTCTTCGGGCCCCCTGAACCTGTGTTTCATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGCTGGGCTT
GAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTTCTGGAGGGCTCCAGTCTTC
CTTGCTCTGTCTTGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACAGATACAGCCATGACCCAGGC
TCCACCAAGCATCTTCATGTCCCCCTGCTCATCCCCCACTCCCCCAACCCAGAGTTGCTCATCTGCCA
GGGCTGGCTGTGCCCCACCCCAAGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCCAGAAGTGCCTGATCGTGGCCTGGCCCA
GTTTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCTCTCTTTGACCCGCTGTACCTAACCA
GACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACCTCTTGAAATGACTGAGGCAGATTCTTCTGAAGCCCATTTCT
CCATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCT
CCGTTTAGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTCTATCTCCTCC
TCAGACTTGACCAGGCCAGCAGGCCCCAGAAGACCATTACCTATATCCCTTCTCCTCCTAGTCACAT
GGCCATAGGCCTGCTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGAGGAAGCACAT
CACCATTGACCCCGCAACCCCTCCCTTTCTCCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACT
TCTTTGTGCTGTGCTGTCCCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGCT
GTTCTCTGAATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCCTCCAAGGCCCTGCTAAAGGACAC
AGCAGCCAGGAAGTCCCTTGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTCTACCAGGAATGGC
CTTGCTCTATGGAAGGCATGCCCCATCCCAACTAATCTAGGAATCACTGTCTAACCACTCACTGTCTAT
GAATGTGTAATTAAGGATGAGTTGAGTCTACCAATAGTGATTTCGATAGTTCAAAATGGTGAAATT
AGCAATTCTACATGATTAGTCTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAAGTCTCCTGTTCTCTTA
AGCTTACTCACTGACAGCCTTTCACCTCTCCACAAATACATTAAAGATATGGCCATCACCAAGCCCCCTAG
GATGACACCAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCCCCTGACAGCTGTGTGA
CCTTCGTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCATTGCTAGTAAGACCTGCCTTTGAGTTGGTATG
ATGTTCAAGTTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAACTACATTTCTTGCA

Figura 8A

SEQ ID NO:2

>gi|189163525|ref|NM_001002235.2| Inhibidor de serpina peptidasa de Homo sapiens, clado A (alfa-1 antiproteinasas, antitripsina), miembro 1 (SERPIN1), variante de transcrito 3, ARNm

TGGGCAGGAAGTGGGCACCTGTGCCAGGGCATGCACCTGCCACGCAGCAACCCTCAGAGTCCTGAGCT
GAACCAAGAAGGAGGAGGGGGTCCGGCCCTCCGAGGAAGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCCAGG
TTGGAGGGGGCGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCCTCTGTGCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGGACAATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAG
GCCTGTGCTGCCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATAC
ATCCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGCTGAGTTCGCCTTCAGC
CTATACCGCCAGCTGGCACACCAAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCCAGTGAGCATCGCTACAG
CCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAA
CCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTCCAGGAACTCCTCCGTACCCCTCAACCAGCCA
GACAGCCAGTCCAGCTGACCAACCGCAATGGCCTGTTCCCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGT
TTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGC
CAAGAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTGTGTCAAGGAGCTT
GACAGAGACACAGTTTTTGTCTGGTGAATTACATCTTCTTAAAGGCAATGGGAGAGACCCCTTGAAG
TCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACAGGTGACCAACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCG
TTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGC
AATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCTGATGAGGGGAACTACAGCACCTGGAAAATGAATCACCCACG
ATATCATACCAAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAACTGTCCAT
TACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTCTGGGTCAACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCT
GACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCA
TCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGTGGGGCCATGTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCCGA
GGTCAAGTTCAACAAACCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGA
AAAGTGGTGAATCCACCCAAAAATAACTGCCTCTCGCTCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCC
TCCCTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCTGCTGATGTGACTGTAAATCCCTCCCATGTT
TTCTCTGAGTCTCCCTTTGCCTGCTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAGGTAACAGTGTCTTTCGGGCCCC
CTGAAGTGTGTTTATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGCTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAATC
CTCAGCTTACGGACCTGGGCCATCTGTTTTCTGGAGGGCTCCAGTCTTCTTGTCTGTCTTGGAGTCCC
CAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACAGATACAGCCATGACCCAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTC
CCCCGCTCATCCCCACTCCCCCCACCCAGAGTTGCTCATCCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCCA
AGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCCAGAACTGCCTGATCGTGCCGTGGGCCAGTTTTGTGGCATCTGCAGCAA
CACAAGAGAGAGGACAATGTCCTCCTTTGACCCGCTGTCACTAACCAGACTCGGGCCCTGCACCTCTC
AGGCACTTCTGGAATGACTGAGGCAGATTCTTCTGAAGCCATTCTCCATGGGGCAACAAGGACACC
TATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCTCCGTTTGAATCAGGTCCCTT
CTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTCTATCTCTCCTCAGACTTGACCAGGCCAGC
AGGCCCCAGAAAGACATTACCTTATATCCCTTCTCCTCCCTAGTCACATGGCCATAGGCCCTGTGTATGGC
TCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGAGGAAGACATACCCATTGACCCCGCAACC
CCTCCCTTTCTCCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACTTCTTTGTGCTGTGCTGTCC
CTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGCTGTTCTGAAATAGCCCCCTGTGG
TAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCCTCCAAGGCCCTGCTAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCCTGG
GCCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTCTACCAGGAATGGCCTTGTCTATGGAAGGCACTG
CCCCATCCCAAACTAATCTAGGAATCACTGTCTAACCCTCACTGTCTATGAATGTGTACTTAAAGGATGA
GGTTGAGTCATACCAAAATAGTGATTTCGATAGTTCAAAATGGTGAAATTAGCAATTCTACATGATTCAGT
CTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAAAGTCTCCTGTTCTTAAAGCTTACTCACTGACAGCCTT
TCACTCTCCACAAATACATTAAAGATATGGCCATCACCAAGCCCCCTAGGATGACACCAGACCTGAGAGT
CTGAAGACCTGGATCCAAGTCTGACTTTTCCCCCTGACAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACC
TCTCTGAGCCCCAGTCATTGCTAGTAAGACCTGCCTTTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAA
ATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAACTACATTTCTTGCA

Figura 8B

SEQ ID NO:3

>gi|189163526|ref|NM_001002236.2| Inhibidor de serpina peptidasa de Homo sapiens, clado A (alfa-1 antiproteinas, antitripsina), miembro 1 (SERPINA1), variante de transcrito 2, ARNm

TGGGCAGGAAGTGGGCACTGTGCCAGGGCATGCACTGCCCTCCACGCAGCAACCCCTCAGAGTCTGAGCT
GAACCAAGAAGGAGGAGGGGTCGGGCTCCGAGGAAGGCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCAGG
TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCAGAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGGGCGGCAGTAAGTCTTCAGCATCAGGCATTTTGGGGTGAATCAG
TAAATGGTAGATCTTGCTACCAGTGGAAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAA
GTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCAGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTC
TGAGCCAGGTACATGACTCCTTCGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGGA
CGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCG
TCTTCTGTCTCGTGGGCACTCCTCCTGCTGGCAGGCTGTGCTGCCCTGGTCCCTGTCTCCTCGGCTGAGG
ATCCCCAGGGAGATGTGCCAGAGACAGATACATCCACCATGATCAGGATCACCAACCTTCAACAA
GATCACCCCAACCTGGCTGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCAGACAGTCCAAAGCAGCACC
AATATCTTCTTCTCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACA
CTCAGCATGAATTCCTGGAGGGCTGAATTTCAACCTCAGCGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAAGTCTCCTGATCCCTCAACAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGCAATGGCCTG
TTCTCAGCGAGGGCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAAG
CCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAGGGTAC
TCAAGGGGAAAATTGGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTGTCTGTGGTGAATTACATC
TTCTTTAAAGGCAATGGGAGAGACCCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGGAGTCTCCACGTGGACC
AGGTGACCAACCGTGAAGGTGCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAAGCT
CTCTCCAAGGCGGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGAGTGAAGCTGCTGGGGCCATGT
AAATACAGCACCTGGAAAATGAATCAACCCAGATATCATCAACCAAGTTCTGGAAAATGAAGACAGAA
GGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTCGGGTCA
ACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGTGAACCTCTCCGGGGTCAAGAGAGGACCCCTGAAG
CTCTCCAAGGCGGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGAGTGAAGCTGCTGGGGCCATGT
TTTTAGAGGCCATACCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTTGTCTTCTTAATGAT
TGAAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAAATAACTGCCTCTC
GCTCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCC
CTGCTGCAATGTGACTGTAATCCCTCCCATGTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCCTGCTGAGGCTGTATG
TGGGCTCCAGGTAACAGTGTGTCTTCGGGCCCCCTGAACGTGTGTTTATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGC
ACATGCTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCATCTGTTTCTGGAG
GGCTCCAGTCTTCTTGTCTGTCTTGGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACAGATACAGC
CATGACCCCAAGCTCCACCAAGCATCTTCAATGTCCTCCCTGCTCATCCCCCACTCCCCCAACCCAGAGTT
GCTCATCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCCAAGGCTGCCCTCCTGGGGGGCCAGAACTGCCTGATC
GTGCCGTGGCCAGTCTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCTCCTCTTGACCCGC
TGTCACCTAACCAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACCTTCTGGAAAATGACTGAGGCAGATTCTTCC
TGAAGCCCAATTCCTATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAA
GCCTCACATATCTCCGTTTAGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTT
CTCTATCTCCTCCTCAGACTTGACCAAGGCCAGCAGGCCCCAGAGACATTACCCATATACCTTCTTCC
TCCCTAGTCACATGGCCATAGGCCTGTGTATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGG
AGAGGAAGCACATCACCCATTGACCCCGCAACCCCTCCCTTTCTCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCAC
ATGCAGCCTGACTTCTTGTGCTGTGTCTGCTGCTCCCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCC
ACGGCAGGAGGCTGTTCTGAATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCCTCCAGGGCCC
TGCTAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCTGGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTC
TACCAGGAATGGCCTTGTCTATGGAAGGCACTGCCCATCCCAAATAATCTAGGAATCACTGTCTAAC
CACTCACTGTGATGAATGTGTACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAATAAGTGATTTCGATAGTTCA
AAATGGTGAATTAGCAATTCTACATGATTAGTCTAATCAATGGATACCGACTGTTCCACACAAAGTC
TCCTGTTCTCTTAAGCTTACTCACTGACAGCCTTTCACTCTCCACAAATACATTAAAGATATGGCCATCA
CCAAGCCCCCTAGGATGACACAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCCCCT
GACAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCAATTGCTAGTAAGACCTGCCT
TTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAAC
TACATTTCTTGCA

Figura 8C

SEQ ID NO:4
>gi|189163527|ref|NM_001127700.1| Inhibidor de serpina peptidasa de Homo sapiens, clado A (alfa-1 antiproteinas, antitripsina), miembro 1 (SERPIN1), variante de transcrito 4, ARNm
TGGGCAGGAAGTGGGCACTGTGCCAGGGCATGCACTGCCTCCACGCAGCAACCCCTCAGAGTCTGTAGCT
GAACCAAGAAGGAGGAGGGGCTCGGGCTCCGAGGAAGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCCAGG
TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGGTGGGACATTGCTGCTGCTGCTCACTCAGTTCCACAGGACAATG
CCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTG
AGGATCCCCAGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATACATCCACCATGATCAGGATACCCCAACCTTCAA
CAAGATCACCCCAACCTGGCTGAGTTTCGCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGC
ACCAATATCTTCTTCTCCCACTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTG
ACACTCACGATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGA
AGGCTTCCAGGAAGTCTCCTGACCTCAACCCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAATGGC
CTGTTCTCAGCAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAG
AAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGGAAGGG
TACTCAAGGAAAAATTGTGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGTCTGGTGAATTAC
ATCTTCTTTAAAGGCAATGGGAGAGACCTTTGAAGTCAAGGACACCAGGAAGAGGACTTCCACGTGG
ACCAGGTGACCAACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCGTTTAAAGCATGTTAATCATCCAGCACTGTAAGAA
GCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCATCTTCTTCTGCTGATGAG
GGGAAACTACAGCACCTGGAATAATGAATCACCACAGATATCATACCAAGTTTCTGGAAAAATGAAGACA
GAAGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGG
TCAACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTG
AAGCCTTCCAAGGCGGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCA
TGTTTTTAGAGGCCATACCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTTGTCTCTTAAT
GATTGAACAAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAAGTGGTGAATCCCAACCAAAAAATACTGCT
CTCGCTCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAGAAGGGTTGAGCTGG
TCCCTGCTGCATGTGACTGTAAATCCCTCCCATGTTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCTGCTGAGGCTGT
ATGTGGGCTCCAGGTAACAGTGTGCTTTCGGGCCCTGAACTGTGTTTATGGAGCATCTGGCTGGGTA
GGCAGATGTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGGCCATCTGTTCTG
GAGGGCTCCAGTCTTCTTGTCTGTCTGGAGTCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACAGATACC
AGCCATGACCCCAAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTCCCTGCTCATCCCCCACTCCCCCCCCAGGA
GTTGCTCATCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCCAAGGCTGCCCTCTGGGGGCCCCAGAACTGCCTG
ATCGTGCCGTGGCCAGTTTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAAGAGAGAGGACAATGCTCCTCTTGACC
CGCTGTCACCTAACCAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACTTCTGGAAAAATGACTGAGGCAGATTCT
TCTGAAGCCCATCTCCTATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCCTTGTCTTCCATCGCTGCCCGAG
AAAGCCTCACATATCTCCGTTTAGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGCTCTGCTTTGT
TTTCTCTATCTCCTCCTCAGACTTGACCAGGCCAGCAGGCCCAAGAACATTACCTATATCCCTTC
TCTCCCTAGTCACATGGCCATAGGCCTGCTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTAT
GGGAGAGGAAGCACATACCCATTGACCCCGCAACCCCTCCCTTTCTCCTCTGAGTCCCGACTGGGGC
CACATGCAGCCTGACTTCTTTGTGCTGTGCTGCTCCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGT
GCCACGGCAGGAGGCTGTTCTGAATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCCTCCAAGG
CCCTGCTAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCTGGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCTCCGT
CTCTACCAAGGAATGGCCTTGTCTATGGAAGGCACTGCCCCATCCCAACTAATCTAGGAATCACTGTCT
AACCCTCACTGTGATGAATGTGTACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAATAGTGATTTGATAGT
TCAAAATGGTGAATTAGCAATTCTACATGATTCACTCAATCAATGGATACCGACTGTTTCCCACACAA
GTCTCCTGTTCTTAAAGCTTACTCACTGACAGCCTTCACTCTCCACAAATACATTAAAGATATGGCCA
TCACCAAGCCCCCTAGGATGACACAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCC
CCTGACAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTATTGCTAGTAAGACCTG
CCTTTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAAATAATAG
AACTACATTTCTTGCA

Figura 8D

SEQ ID NO:5
>gi|189163529|ref|NM_001127701.1| Inhibidor de serpina peptidasa de Homo sapiens, clado A (alfa-1 antiproteinas, antitripsina), miembro 1 (SERPINA1), variante de transcrito 5, ARNm

TGGGCAGGAACCTGGGCACTGTGCCAGGGCATGCACTGCCTCCACGCAGCAACCCCTCAGAGTCTGAGCT
GAACCAAGAAGGAGGAGGGGCTCGGGCTCCGAGGAAGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCCAGG
TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCTGCCAGAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGGTGGGACATTGCTGCTGCTGCTCACTCAGTTCCACAGGGCGGCA
GTAAGTCTTCAGCATCAGGCATTTTGGGGTGACTCAGTAAATGGTAGATCTTGCTACCAGTGGAAACAGCC
ACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAAGTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCACGC
CACCCCTCCACCTTGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGCAGCTCCCCCGTTGCCCTCTGGA
TCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGA
CAGTGAATCGACAATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCGTGGT
CCTGTCTCCTGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCAGAAAGACAGATACATCCACCATGATCAGG
ATCACCCACCTTCAACAAGATCACCCCAACCTGGCTGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGC
ACACAGTCCCAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCC
CTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGG
AGGCTCAGATCCATGAAGGCTTCCAGGAACCTCCTCGTACCTCAACCGCCAGACAGCCAGCTCCAGCT
GACCACGGCAATGGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAA
AAGTTGTATCCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACG
ATTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAATTTGTGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACAGATTTT
TGCTCTGGTGAAATACATCTTCTTTAAAGGCAATGGGAGAGACCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAA
GAGGACTTCCACGTGGACCAAGGTGACCAACCTGAAGGTGCCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAA
TCCAGCAGCTGAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCCTCT
CTTCTGCCTGATGAGGGGAACTACAGCACCTGGAAAATGAACTACCCACGATATCATCACCAAGTTC
CTGGAATAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATC
TGAAGAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCA
AGAGGAGGCACCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACT
GAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAC
CCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCAC
CCAAAAATAACTGCCTCTCGCTCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAA
AGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAATCCCTCCCATGTTTTCTGTAGTCTCCCT
TGCTGCTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAGGTAAACAGTGTCTTTCGGGCCCTGAACTGTGTTTATGG
AGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTG
GGCCCATCTGTTTTCTGGAGGGCTCCAGTCTTCTTGTCTGTCTGGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGG
GGAGGAACCAAGATACCAAGCCATGACCCCAAGGCTCCACCAAGCATCTCATGTCCCCCTGCTCATCCCCA
CTCCCCCCCCACCAAGATTGCTCATCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCCCCCCCAAGGCTGCCCTCCTGGGG
GCCCCAGAACTGCCTGATCGTGGCCAGTCTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAA
TGTCCTCTCTTGACCCGCTGTACCTAACCAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACTTCTGGAAAAT
GACTGAGGCAGATTCTTCTGAAGCCATTCTCCATGGGGCAACAAGGACACCTATCTGTCTCTGTCTCT
TCCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCTCCGTTTAGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGG
AGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTCTATCTCTCTCAGACTTGACCAAGGCCAGCAGGCCCCAGAAAGACCAT
TACCCATATATCCCTTCTCTCCCTAGTCACATGGCCATAGGCCTGCTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCA
AGGACTCCTCAGCTATGGGAGAGGAAGCACATCACCCATTGACCCCGCAACCCCTCCCTTCTCTCTCT
GAGTCCCGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACTTCTTTGTGCTGTGCTGTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
CCACCGCAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGCTGTTCTGAATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTC
CTTCCATCTCTCAAGGCCCTGCTAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCTGGGGCCCTAGCTGAAGGAC
AGCCTGCTCCCTCCGTCTCTACCAAGGAATGGCCTTGTCTATGGAAGGCACTGCCCCATCCCAACTAAT
CTAGGAATCACTGTCTAACCCTCACTGTCTGATGAATGTGTACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCATACAAA
TAGTGATTTTCGATAGTTCAAAATGGTGAAATTAGCAATTCTACATGATTCAGTCTAATCAATGGATACCG
ACTGTTTCCACACAAGTCTCTGTTCTCTTAAGCTTACTCACTGACAGCCTTCTACTCTCCACAATAC
ATTAAAGATATGGCCATCACCAAGCCCCCTAGGATGACACCAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCA
AGTTCTGACTTTTCCCCCTGACAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCA
TTGCTAGTAAGACCTGCCTTTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAG
AACAGAGAATAAATAGAACTACATTTCTTGCA

Figura 8E

SEQ ID NO:6

>gi|189163531|ref|NM_001127702.1| Inhibidor de serpina peptidasa de Homo sapiens, clado A (alfa-1 antiproteinasas, antitripsina), miembro 1 (SERPINA1), variante de transcrito 6, ARNm

TGGGCAGGAAGTGGGCACTGTGCCAGGGCATGCACTGCCTCCACGCAGCAACCCTCAGAGTCTGTAGCT
GAACCAAGAAGGAGGAGGGGCTCGGGCTCCGAGGAAGGCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCCAGG
TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCTGCCAGAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGGTGGGACATTGCTGCTGCTGCTCACTCAGTTCCACAGCAGCCTC
CCCCCTTGCCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCTCAGCTTCAGGC
ACCACCCTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCTCTCTGTGGCA
GGCTGTGTGCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATA
CATCCCACCATGATCAGGATCACCAACCTTCAACAAGATACCCCCAACCTGGCTGAGTTCGCCTTCAG
CCTATACGCCCACTGGCACACCAAGTCCAAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCACTGAGCATCGCTACA
GCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATGAAATCCTGGAGGGCTGAAATTTCA
ACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTCCAGGAACCTCCTCCGTACCTCAACCAGCC
AGACAGGCAGCTCCAGCTGACCAACCGGCAATGGCTGTCTCAGCGAGGGCTGAAGCTAGTGGATAAG
TTTTTGGAGGATGTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGG
CCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGCTACTCAAGGGAAAATGTGGATTGGTCAAGGAGCT
TGACAGAGACACAGTTTTTGTCTGCTGGTGAATTACATCTTCTTAAAGGCAAAATGGGAGAGACCCCTTGAA
GTTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAAGAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGG
CAATGCCACCGCCATCTTCTCCTGCTGATGAGGGGAAATACAGCACCTGGAATAAGTCAACCCAC
GATATCATCACCAAGTTCTGGAAAATGAAGACAGAAGGCTCTGCCAGCTTACATTTACCCAAACTGTCCA
TTACTGGAACTATGATCTGAAGAGCTCTGGGTCACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGC
TGACCTCTCCGGGTACAGAGGAGGACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGTGACC
ATCGACGAGAAAGGACTGAAGCTGCTGGGGCATGTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCCCC
AGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCCCTCTCATGGG
AAAAGTGGTGAATCCCAACCAAAAATAACTGCCTCTCGCTCCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCC
CTCCCTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAATCCCTCCCATGT
TTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCTGTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAGGTAACAGTGTGTCTTCGGGGCC
CCTGAAGTGTGTTTCATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAAT
CCTCAGCTTACGGACCTGGGGCCATCTGTTTCTGGAGGGCTCCAGTCTTCCCTTGCTCTGTCTTGGAGTCC
CCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACAGATACAGCCATGACCCAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGT
CCCCCTGCTCATCCCCACTCCCCCCACCCAGAGTTGCTCATCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCCC
AAGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCCAGAACTGCCTGATCGTGCCGTGGGCCAGTTTTGTGGCATCTGCAGCA
ACACAAGAGAGAGGACAATGTCTCTCTTGACCCGCTGTCACTAACAGACTCGGGCCCTGCACCTCT
CAGGCACCTCTGGAAAATGACTGAGGCAGATTCTTCTGAAGCCATTCTCCATGGGGCAACAAGGACAC
CTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCTCCGTTTGAATCAGGTCCCT
TCTCCCCAGATGAAGAGGAGGCTCTGCTTTGTTTTCTCTATCTCCTCCTCAGACTTGACCAGGCCCCAG
CAGGCCCCAGAAAGACCAATTACCTATATCCCTTCTCCTCCCTAGTCACATGGCCATAGGCCTGTGATGG
CTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGAGGAAGCACATCACCCATTGACCCCCGCAAC
CCCTCCCTTTCTCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACTTCTTTGTGCTGTGTCTGTC
CCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGCTGTTCTGAAATAGCCCTGTG
GTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCTCCAAAGGCCCTGCTAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCTG
GGCCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTCTACCAGGAATGGCCTGTCTCTATGGAAGGCACT
GCCCCATCCCAAATAATCTAGGAATCACTGTCTAACCACCTCACTGTCTGATGTGATCTTAAGGATG
AGGTTGAGTCATACCAATAGTGATTTTCGATAGTTCAAAATGGTGAAATTAGCAATTCTACATGATTGAG
TCTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAAGTCTCCTGTTCTCTTAAGCTTACTCACTGACAGCCT
TTCCTCTCCACAATAACATTAAAGATATGGCCATCACCAAGCCCCCTAGGATGACACCAGACCTGAGAG
TCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCCCCTGACAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAAC
CTCTCTGAGCCCCAGTCATTGCTAGTAAGACCTGCCTTTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAA
AATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAATACTATTTCTTGCA

Figura 8F

SEQ ID NO:7

>gi|189163533|ref|NM_001127703.1| Inhibidor de serpina peptidasa de Homo sapiens, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 1 (SERPIN1), variante de transcrito 7, ARNm

TGGGCAGGAACCTGGGCACTGTGCCAGGGCATGCACTGCCTCCACGCAGCAACCCCTCAGAGTCTGTAGCT
GAACCAAGAAGGAGGAGGGGTCGGGCTCCGAGGAAGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCAGG
TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGGGCGGCAGTAAGTCTTCAGCATCAGGCATTTTGGGGTGACTCAG
TAAATGGTAGATCTTGCTACCACTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAA
GTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCAGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTC
TGAGCCAGCAGCCTCCCCCTGTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCT
TCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGC
ATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCCTGGTCCCTGTCTCCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTG
CCCAGAAGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCAGCCACCTTCAACAAGATCAGCCCCAACCTGGC
TGAGTTTCGCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCACACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCA
GTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCAGATGAAATCTGG
AGGGCTGAATTTCAACCTCAGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTCCAGGAATCCTCCG
TACCTCAACACAGCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCAACCGCAATGGCTGTCTCCTCAGGAGGGCCCTG
AAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAGAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCG
GGGACACCGAAGAGGCCAAGAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAATTCAGGAA
TTTGTGTCAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGTCTGTGTAATTACATCTTCTTTAAAGGCAATGG
GAGAGACCCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAAGGTGACCAACCGTGAAGG
TGCCATATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAAATCCAGCACTGTAAGAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCT
GATGAATATCCTGGCAATGCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCA
AATGAATCACCACAGATATCATCACCAGTTCTCTGGAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACATT
TACCCAAATCTGCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATCATAAGGT
CTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCAT
AAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCA
TGTCTATCCCCCAGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTC
TCCCTCTTTCATGGGAAAGTGGTGAATCCACCCAAAAATAAGTCCCTCTCGCTCCTCAACCCCTCCCC
TCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGT
AAATCCCTCCCATGTTTTCTGTGAGTCTCCCTTTCCTGCTGCTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAGGTAACAGT
GCTGTCTTTCGGGGCCCCGAACTGTGTTTATGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGCTGGGCTTGAATC
CAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTTCTGGAGGGCTCCAGTCTTCTTGT
CCTGTCTTGGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACAGATACAGCCATGACCCAGGCTCCAC
CAAGCATCTTCATGTCCCCCTGCTCATCCCCACTCCCCCACCAGAGTTGCTCATCTGCCAGGGCT
GGCTGTGCCACCCCAAGGCTGCCTCCTGGGGGCCCCAGAACTGCCTGATCGTGCCGTGGCCAGTTTT
GTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGACAATGTCTCCTCTTGACCCGCTGTCACCTAACAGAGCTC
GGGCCCTGCACCTCTCAGGCACTTCTGGAAAAAGTACTGAGGCGAGATTCTTCTGAAGCCCATCTCCATG
GGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCTCCGTT
TAGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTCTATCTCCTCCTCAGA
CTTGACAGGCCAGCAGGCCCCAGAAAGACATTACCTATATCCCTTCTCCTCCCTAGTCACATGGCCA
TAGGCCTGTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGAGGAAGCACATCAGCC
ATTGACCCCGCAACCCCTCCCTTTCCTCCTGAGTCCCAGTGGGGCCACATGCAGCCTGACTTCTTT
GTGCTGTGTGCTGCTTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGCTGTTC
TGAATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCCTCCAAGGCCCTGCTAAAGGACACAGCAG
CCAGGAAGTCCCCTGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGCTCTACAGGAATGGCCTTGT
CCTATGGAAGGCACCTGCCCCATCCCAAACTAATCTAGGAATCACTGTCTAACCACTCACTGTCTGAATG
TGTAATTAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAATAGTGATTTCGATAGTTCAAATGGTGAATTAGCAA
TTCTACATGATTGAGTCTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAAGTCTCCTGTCTCTTAAGCTT
ACTCACTGACAGCCTTTCACCTCCACAAATACATTAAAGATATGGCCATCACCAGCCCCCTAGGATGA
CACCAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTCTGACTTTTCCCCCTGACAGCTGTGTGACCTTC
GTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCATTGCTAGTAAGACCTGCCTTGTAGTTGGTATGATGTT
CAAGTTAGATAACAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAACTACATTCTTGCA

Figura 8G

SEQ ID NO:8

>gi|189163535|ref|NM_001127704.1| Inhibidor de serpina peptidasa de Homo sapiens, clado A (alfa-1 antiproteinas, antitripsina), miembro 1 (SERPIN1), variante de transcrito 8, ARNm

TGGGCAGGAAGTGGGCACTGTGCCAGGGCATGCACTGCCTCCACGCAGCAACCCTCAGAGTCTGTAGCT
GAACCAAGAAGGAGGAGGGGTCGGGCCTCCGAGGAAGGCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCCAGG
TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCTGCCAGAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGGGCGGCAGTAAGTCTTCAGCATCAGGCATTTTGGGGTGACTCAG
TAAATGGTAGATCTTGCTACCAAGTGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAA
GTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCAGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTC
TGAGCCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCC
TCAGCTTCAGGCACCACCCTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGCTCTTCTGTCTCGTGGGCACTC
CTCCTGGTGGCAGGCCTGTGCTGCCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCC
AGAAGACAGATACATCCACCATGATCAGGATACCCAACCTTCAACAAGATACCCCCAACCTGGCTGA
GTTCCGCTTCAGCCTATACGCCAGCTGGCACACCAGTCCAAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCAAGTG
AGCATCGCTTACAGCCTTTGCAATGTCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCAGATGAAATCTGGAGG
GCCTGAATTTCAACCTCAGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTCCAGGAACTCCTCCGTAC
CCTCAACGAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAATGGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAG
CTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACGTGCAACTTCGGGG
ACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGTAAGTCAAGGGAATTTGTGATTT
GGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTCTTTAAAGGCAATGGGAG
AGACCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACAGGTGACCACCGTGAAGGTGC
CTATGATGAAGCGTTTAAAGCATGTTTAAATCCAGCACTGTAAAGAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGAT
GAAATCGCTGGGCAATGCCACCGCATCTTCTCTGCTGATGAGGGGAACTACAGCACCTTGGAAAT
GAATCACCACGATATCATCACCAAGTTCTTGGAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACATTTAC
CCAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATCAGTAAGGTCTT
CAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCAAGAGGAGGACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAG
GCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGACTGAAGCTGCTGGGGCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGT
CTATCCCCCCCCAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCC
CCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCAACCAAAATAACTGCCTCTCGCTCCTCAACCCTCCCCCTCC
ATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAA
TCCCTCCCATGTTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCCTGCTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAGGTAAACAGTGT
GTCTTCGGGCCCCCTGAACTGTGTTTCATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGCTGGGCTTGAATCCAG
GGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCCTCTGTTTCTGGAGGGCTCCAGTCTTCTTGTCTCT
GTCTTGGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACAGATACCAAGCCATGACCCAGGCTCCACCAA
GCATCTTCATGTCCCCCTGCTCATCCCCCACTCCCCCAACCCAGAGTTGCTCATCCTGCCAGGGCTGGC
TGTGCCCCACCAAGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCAAGAACTGCCTGATCGTGCCTGGGCCAGTTTGTG
GCATCTGCAGCAACACAGAAGAGAGGACAAATGCTCCTCTTGACCCGCTGTCACCTAACCCAGACTCGGG
CCCTGCACCTCTCAGGCACTTCTGGAAATGACTGAGGCAGATTCTTCTGAAGCCCATTTCTCCATGGGG
CAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCTCCGTTTAG
AATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGCTCTGCTTTGTTTTCTCTATCTCCTCCTCAGACTT
GACCAAGGCCAGCAGGCCCCAGAAGACCTTACCTATATCCCTTCTCCTCCCTAGTCACATGGCCATAG
GCCTGCTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGAGGAAGCACATCAACCAATT
GACCCCGCAACCCCTCCCTTTCTCTCTGAGTCCGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACTTCTTTGTG
CCTGTTGCTGTCCCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGCTGTTCTGTA
ATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCCTCCAAGGCCCTGCTAAAGGACACAGCAGCCA
GGAAGTCCCCTGGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCTCCGTCTCTACCAGGAATGGCCTTGTCTCT
ATGGAAGGCACTGCCCCATCCAACTAATCTAGGAATCACTGTCTAACCCTCAGTGTCTATGAATGTGT
ACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAAAATAGTGATTTTCGATAGTTCAAAATGGTGAAATTAGCAATTC
TACATGATTGAGTCTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAAAGTCTCCTGTTCTCTTAAGCTTACT
CACTGACAGCCTTCACTCTCCACAAATACATTAAGATATGGCCATCAACCAAGCCCCCTAGGATGACAC
CAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCCCCTGACAGCTGTGTGACCTTCGTG
AAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCAATTGCTAGTAAGACCTGCCCTTGAGTTGGTATGATGTTCAA
GTTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAACTACATTTCTTGCA

Figura 8H

SEQ ID NO:9

>gi|189163537|ref|NM_001127705.1| Inhibidor de serpina peptidasa de Homo sapiens, clado A (alfa-1 antiproteinas, antitripsina), miembro 1 (SERPIN1), variante de transcrito 9, ARNm

TGGGCAGGAAGTGGGCACTGTGCCAGGGCATGCACTGCCTCCACGCAGCAACCCTCAGAGTCTGAGCT
GAACCAAGAAGGAGGAGGGGTCGGGCCTCCGAGGAAGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCCAGG
TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGGGCGGCAGTAAGTCTTCAGCATCAGGCATTTTGGGGTGACTCAG
TAAATGGTAGATCTTGCTACCAGTGGAACAGCCACTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCAGAGGGCCAGCTAA
GTGGTACTCTCCAGAGACTGTCTGACTCAGCCACCCCTCCACCTTGGACACAGGACGCTGTGGTTTC
TGAGCCAGGTACATGACTCCTTCGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGA
GGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGTCT
TCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCTGGCTGAGGATC
CCCAGGGAGATGTCTGCCAGAAGACAGATACATCCCACTGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGAT
CACCCCCAACCTGGCTGAGTTTCGCCCTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACAGTCCAACAGACCAAT
ATCTTCTTCTCCCACTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACATC
ACGATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAGGCTT
CCAGGAACCTCCTCGTACCCTCAACCCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGCAATGGCTGTTC
CTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACCTCAGAGCCT
TCACCTGTCAACTTCGGGGACCCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTACTCA
AGGGAAAAATTGTGATTGTGTCAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTGTGCTGTGTAATTACATCTTC
TTTAAAGGCAAAATGGGAGAGACCCCTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGG
TGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAAGAGCTGTC
CAGCTGGGTGCTGCTGAATATCCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTCTGCTGATGAGGGGAAA
CTACAGCACCTGGAAAAATGAACTCACCCACGATATCATCCAAGTTCTCGAAAAATGAAGACAGAAGGT
CTGCCAGCTTACATTTACCCAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCCGGGTCAACT
GGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTC
TCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGAGTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTT
TAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTTGTCTTCTTAATGATTGA
ACAAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAAAAATAACTGCCTCTCGCT
CCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTG
CCTGATGTGACTGTAAATCCTCCCATGTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCCCTGCTGAGGCTGTATGTGG
GCTCCAGGTAACAGTGTCTTTCGGGGCCCCCTGAACTGTGTTTATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACA
TGCTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTTCTGGAGGGC
TCCAGTCTTCTTGTCTGTCTTGGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACCAGATACAGCCAT
GACCCAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTCCCTGTCTCATCCCCACTCCCCCACCAGAGTGTGCT
CATCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCCAAGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCCAGAAGTGCCTGATCGTG
CCGTGGCCAGTTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCTCCTCTTGACCCGCTGT
CACCTAACCAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACCTTCTGGAAAAATGACTGAGGCAGATTCTCTCTGA
AGCCCATTTCTCCATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCC
TCACATATCTCCGTTTAGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTC
TATCTCCTCCTCAGACTTGACCAGGCCCCAGCAGGCCCCAGAAGACCATTACCTTATATCCCTTCTCTCC
CTAGTCACATGGCCATAGGCCTGTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGA
GGAAGCACATCACCATTGACCCCGCAACCCCTCCCTTTCTCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCACATG
CAGCCTGACTTCTTTGTGCTGTTGCTGTCCCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACG
GCAGGAGGCTGTTCTGAATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTCTCCATCTCCAAGGCCCTGC
TAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCCTGGGGCCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGTCTCCCTCCGCTCTAC
CAGGAATGGCCTTGTCTATGGAAGGCACTGCCCATCCCCAACTAATCTAGGAATCACTGTCTAACCAC
TCACCTGTATGAATGTGACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAAAATAGTGATTTCGATGTTCAAAA
TGGTGAAATTAGCAATTCTACATGATTCAGTCTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAAGTCTCC
TGTTCTCTTAAAGCTTACTACTGACAGCCTTTCACCTCTCCACAAATACATTAAAGATATGGCCATACCA
AGCCCCCTAGGATGACACCCAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCCCCTGAC
AGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCATTGCTAGTAAGACCTGCCTTTG
AGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGATAAATAGAACTAC
ATTTCTTGCA

Figura 8I

SEQ ID NO:10
>gi|189163539|ref|NM_001127706.1| Inhibidor de serpina peptidasa de Homo sapiens, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 1 (SERPIN1), variante de transcrito 10, ARNm

TGGGCAGGAAGTGGGCACTGTGCCAGGCGATGCACTGCCTCCACGCAGCAACCCCTCAGAGTCTTGAGCT
GAACCAAGAAGGAGGAGGGGTCGGGCTCCGAGGAAGGCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCCAGG
TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCTGCCAGAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGA
CGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCG
TCTTCTGTCTCGTGGGCATCCTCCTGTGCGCAGGCTGTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCTTGGCTGAGG
ATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATACATCCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAA
GATCACCCCAACCTGGCTGAGTTTCGCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACC
AATACTCTTCTTCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCTTGGGGACCAAGGCTGACA
CTCAGATGAAATCCTGGAGGGCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGG
CTTCCAGGAAGCTCCTCCGTACCCCTCAACAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGGCAATGGCTG
TTCCTCAGCGAGGGCTGAAGCTAGTGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAG
CCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAGGGTAC
TCAAGGAAAATTGTGATTGTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACAGATTTTGTCTGGTGAATTACATC
TTCTTTAAAGGCAATGGGAGAGACCCCTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACC
AGGTGACCCCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCGTTTAGGATGTTTAAACATCCAGCACTGAAGAAGCT
TGCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCTGATGAGGGG
AAACTACAGCACCTGGAATAAGTCAACCCAGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAA
GGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGCTCTGGGTCA
ACTGGGCTCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGTACAGAGGAGGCAACCCCTGAAG
CTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGTGGGGCCATGT
TTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCGGAGGTCAAGTTCACAAACCCCTTTGTCTCTTAATGAT
TGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAGTGGTGAATCCACCCAAAAATAACTGCCTCTC
GCTCTCAACCCCTCCCTCTCATCCCTGGCCCCCTCCTTGATGACATTAAGAAGGGTTGAGCTGGTCC
CTGCTGCTGCTGACTGTAATCCCTCCCATGTTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCCTGCTGAGGCTGTATG
TGGGCTCCAGGTAAACAGTGCTGTCTTCGGGCCCTGAACGTGTGTTTATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGC
ACATGCTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTTCTGGAG
GGCTCCAGCTTCTTGTCTGTCTTGGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACAGATACCAAGC
CATGACCCAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTCCCCCTGCTCATCCCCCACTCCCCCCCCACCCAGATT
GCTCATCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCCCACCCCAAGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCCAGAAGTGCCTGATC
GTGCCGTGGCCAGTTTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCTCTCTTGTACCCGC
TGTCACCTAACCAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACCTCTGGAAAATGACTGAGGCAGATTCTTCC
TGAAGCCCATCTCCATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAA
GCCTCACATATCTCCGTTTGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTT
CTCTATCTCTCTCCTCAGACTTGACCAGGCCCCAGCAGGCCCCAGAAGACCATTACCCATATATCCCTTCTCC
TCCCTAGTCACATGGCCATAGGCCTGCTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGG
AGAGGAAGCACATACCCATTGACCCCCGCAACCCCTCCCTTTCTCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCAC
ATGCAGCCTGACTTCTTGTGCCTGTTGCTGTCCCTGCAGTCTTCAGAGGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCC
ACGGCAGGAGGCTGTTCTGATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCCTCCAAGGCCCC
TGCTAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCTGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTC
TACCAGGAATGGCCTTGTCTATGGAAGGCACGTGCCCCATCCCAACTAATCTAGGAATCACTGTCTAAC
CACTCACTGTCAATGTGTACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAAAATAGTGATTTTCGATAGTTCA
AAATGGTGAAATTAGCAATTCTACATGATTCACTCAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAAGTC
TCCTGTTCTCTTAAGCTTACTCACTGACAGCCTTCACTCTCCACAAATACATTAAGATATGGCCATCA
CCAAGCCCCCTAGGATGACACCAGCCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCCTCCT
GACAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCATTGCTAGTAAGACCTGCCT
TTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAAC
TACATTTCTTGTCA

Figura 8J

SEQ ID NO:11
>gi|189163541|ref|NM_001127707.1| Inhibidor de serpina peptidasa de Homo sapiens, clado A (alfa-1 antiproteinas, antitripsina), miembro 1 (SERPINA1), variante de transcrito 11, ARNm
TGGGCAGGAACCTGGGCACTGTGCCAGGGCATGCACTGCCTCCACGCAGCAACCCCTCAGAGTCTGAGCT
GAACCAAGAAGGAGGAGGGGCTCGGGCCTCCGAGGAAGGCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCCAGG
TTGGAGGGGCGGCAACCTCCTGCCAGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTG
AGGAGAGCTTGAGGAGAGCAGGAAAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGA
GGACAGGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCCTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGTCT
TCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGTGGCAGGCCTGTGTGCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGAGGATC
CCCAGGGAGATGCTGCCAGAAGACAGATACATCCCAACATGATCAGGATCACCCACCTTCAACAAGAT
CACCCCCAACCTGGCTGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAAT
ATCTTCTTCTCCCAAGTGAAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTC
ACGATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTT
CCAGGAACCTCCTCCGTACCTCAACCCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCAACGGCAATGGCCTGTTC
TGACGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACCTCAGAGCCCT
TCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTACTCA
AGGGAAAAATTTGTGGATTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGTCTGTGTGAATTACATCTTC
TTTAAAGGCAATGGGAGAGACCCCTTTGAAGTCAAGGACACCCAGGAGAGGAGCTTCCACGTGGAGCCAGG
TGACCAACCGTGAAGGTGCCATGTATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCAGTGAAGAGCTGTC
CAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCCCTGCTGATGAGGGGAAA
CTACAGCAGCTGAAAAATGAAGTCAACCCAGATATCATCACCAGTTTCTGGAAAAATGAAGACAGAAGGT
CTGCCAGCTTACATTTACCCAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCTCGGGTCAACT
GGGCATCACTAAGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTC
TCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGTGACCATCGACGAGAAAGGGAAGTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTT
TAGAGGCCATACCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTTGTCTTCTTAATGATTGA
ACAAAAATACCAAGTCTCCCCCTTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCAACCAAAAAATAACTGCCTCTCGCT
CCTCAACCCCTGCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAGAAGGGTTGAGCTGCTCCCTG
CCTGCATGTGACTGTAAATCCCTCCCATGTTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCCTGCTGAGGCTGTATGTGG
GCTCCAGGTAAACAGTGTGTCTTCCGGGCCCCCTGAAGTGTGTTTCATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACA
TGCTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTTCTGGAGGGC
TCCAGTCTTCTTGTCTGTCTTGGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACAGATACCAAGCAT
GACCCAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTCCCCCTGCTCATCCCCACTCCCCCCCACCCAGAGTTGCT
CATCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCCAAGGCTGCCCTCCTGGGGGCCCCAGAACTGCCTGATCGTG
CCGTGGCCAGTTTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCTCTCTTTGACCCGCTGT
CACCTAACCAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCCTTCTGGAAAAATGACTGAGGCAGATTCTTCCTGA
AGCCCATTTCTCCATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCC
TCACATATCTCCGTTTGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTC
TATCTCCTCCTCAGACTTGACCAGGCCCCAGCAGGCCCCAGAAGACCATTACCTATATCCCTTCTCCTCC
CTAGTCACATGGCCATAGGCCTGCTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGGAGA
GGAAGCACATCACCCATTGACCCCCGCAACCCCTCCCTTTCTCCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCACATG
CAGCCTGACTTCTTTGTGCCTGTTGCTGTCCCTGCAGTCTTCAGAGGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACG
GCAGAGGCTGTTCTGAATAGCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCTTCCATCCTCCAAGGCCCTGC
TAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCCCTGGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTTAC
CAGGAATGGCCTTGTCTATGGAAGGCACTGCCCCATCCCCAACTAATCTAGGAATCACTGTCTAACCAC
TCACTGTCAATGAATGTGACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCATACCAATAGTGATTTCGATAGTCAAAA
TGGTGAAATTAGCAATTCTACATGATTGAGTCTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCACACAAGTCTCC
TGTTCTCTTAAGCTTACTCACTGACAGCCTTTCACTCTCCACAAATACATTAAGATATGGCCATCACCA
AGCCCCCTAGGATGACACAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCCCCTGAC
AGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCATTGCTAGTAAGACCTGCCTTTG
AGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAAGTAC
ATTTCTTGCA

Figura 8K

ES 2 676 146 T3

SEQ ID NO:12

>gi|402766667|ref|NM_001266017.2| Inhibidor de serpina peptidasa de
Macaca mulatta, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro
1, (SERPINA1), ARNm
CAGGACAATGCCATCTTCTGTCTCATGGGGCGTCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGCTCCCCGGC
TCTCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCAGAAGACGGATACATCCCACCATGATCAGGACCACC
CAACCCTCAACAAGATCACCCCCAGCCTGGCTGAGTTCGGCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCA
GTCCAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGG
ACCAAGGCTGACACTCACAGTGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACGTCACGGAGATTCCGGAGGCTC
AGGTCCATGAAGGCTTCCAGGAACTCTCCATACCCTCAACAAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCAC
CGGCAACGGCCTGTTCTCAACAAGAGCCTGAAGGTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTCAAAAACTG
TACCACTCAGAAGCCTTCTCTGTCAACTTTGAGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACAATTACG
TGGAGAAGGAACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGTCTCT
GGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCCTTTGACGTTGAGGCCACCAAGGAAGAGGAC
TTCCACGTGGACAGGCGACCACCGTGAAGGTGCCCATGATGAGGCGTTTAGGCATGTTTAACATCTACC
ACTGTGAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCCT
GCCTGATGAGGGGAACTGCAGCACCTGGAATAAGAACTCAGCATGATATCATCACCAGTTCTCTGGAA
AATGAAAACAGCAGGTCTGCCAACTTACATTTACCCAGACTGGCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGA
CAGTCTTGGGCCACCTGGGTATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCGGGGATCACGGAGGA
GGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGATGAGAAAGGGACTGAAGCT
GCTGGGGCATGTTTTTAGAGGCCATACCATGTCTATTCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTG
TCTTCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCCACCCAGAA
ATAACTGCCTGTCACTCCTCAGCCCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGAATGACAT

Figura 8L

ES 2 676 146 T3

SEQ ID NO:13

>gi|297298519|ref|XM_001099255.2|PREDICHO: Inhibidor de serpina peptidasa de Macaca mulatta, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 1, variante de transcrito 6 (SERPINA1), ARNm

GCCCACTCTGTGCTGCTGGCAATGGGCAAGGCCCTTCTGCCCCAGCTCCCCGCCCTCCCCAACCT
TATTGCCTCCGCCACCCGCCACCCGAGGCCAACTTCTGGGTGGGCAGGAAGTGGGCCCTGTGCCAGGG
CGTGCACTGCCTCCACGCAGCAACCTCAGAGTACTGAGCTGAGCAAAGGAGGAGGGGATCAGCACT
CTGAGGAAGGCCTAGCCACTGCTGCTGCCAGGAATTCCAGGGCGGCATCAGTCTTCAGCATCAGGCATTT
CGGGGTGAATTAGTAAATGGTAGATCTTGCTACCAAGTGGAACAGCCGCTAAGGATTCTGCAGTGAGAGCA
GAGGGCCAGCAAAGTGGTACTCTCCAGCGACTGGCTGACTCAGCCACCCCTCCACCTTGGACGCAGG
ACACTGTGGTTTCTGAGCCAGGTACAATGACTCCTTTTGGTACGTGCAGTGGAGGCTGTATGCTGCTCAG
GCAGAGCGTCCGGACAGCGTGGGCGGGCGACTCAGCGCCAGCCTGTGAACCTTAGTCCCTGTTTGTCTCT
CCGGTAACTGGGGTGATCTTGGTTAATATTACCAAGCAGCCTCCCCCGTTGCCCTCTGCACCCACTGCT
TAAATACGGACAAGGACAGGGCTCTGTCTCTCAGCCTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACGGTGAATC
GACAATGCCATCTTCTGTCTCATGGGGCGTCTCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGCTCCCCGGCTCT
CTGGCTGAGGATCCCCAGGAGATGCTGCCAGAAGACGGATACATCCACCATGATCAGGACCAACCCAA
CCCTCAACAAGATCACCCCCAGCCTGGCTGAGTTTCGGCTTCAGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCACTC
CAACAGCACCAATATCTTCTCTCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACC
AAGGCTGCACTCAGAGTGAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACGTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGG
TCCATGAAGGCTTCCAGGAACTCCTCCATACCCTCAACAAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACGG
CAACGGCCTGTTCTCAACAAGAGCCTGAAGGTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTCAAAAACTGTAC
CACTCAGAAAGCCTTCTGTCAACTTTGAGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACAATTACGTGG
AGAAGGAAACTCAAGGAAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGTCTCTGGT
GAATTACATCTTCTTAAAGCAAATGGGAGAGACCCTTTGACGTTGAGGCCACCAAGGAAGAGGACTTC
CACGTGGACCAAGCGACCAACCGTGAAGGTGCCCATGATGAGGCGTTTAGGCATGTTTAACATCTACCACT
GTGAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTCTCTGCC
TGATGAGGGGAACTGCAGCACCTGGAAAAATGAACCTACCCATGATATCATCACCAAGTTCTCTGGAAAAAT
GAAACAGCAGGTCTGCCAACTTACATTTACCCAGACTGGCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGACAG
TCCTGGGCCACCTGGGTATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCGGGGATCACGGAGGAGGC
ACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGATGAGAAAGGGACTGAAGCTGCT
GGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATTCCCCCGAGGTCAGTTCAACAAACCCCTTTGTCT
TCTTAATGATTGAACAAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAAGTGGTGAATCCCAACCCAGAAATA
ACTGCCTGTCACTCCTCAGCCCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGAATGACATTAAAGAAGGGTT
GAGCTGGTCCCTGCCTGCGTGTGTGACTGCAAAC

Figura 8M

ES 2 676 146 T3

SEQ ID NO:14

>gi|297298520|ref|XM_001099044.2|PREDICHO: Inhibidor de serpina peptidasa de Macaca mulatta, clado A (alfa-1 antiproteinasas, antitripsina), miembro 1, variante de transcrito 4 (SERPIN1), ARNm

TCTTGCTGCTGCCTGGCAATGGGCAAGGCCCTTCCTGCCCAAGCTCCCCGCCCTCCCCAACCTATTGC
CTCCGCCACCCGCCACCCGAGGCCAATTCCTGGGTGGGCAGGAAGTGGGCCCTGTGCCCAGGGCGTGCA
CTGCCTCCACGCAGCAACCCCTCAGAGTACTGAGCTGAGCAAAGGAGGAGGGGATCAGCACTCTGAGG
AAGGCCTAGCCACTGCTGCTGCCAGGAATTCAGGACAATGCCATCTTCTGTCTCATGGGGCGTCCCTCT
GCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGCTCCCCGGCTCTCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAG
ACGGATACATCCCACCATGATCAGGACCACCCAACCCCTCAACAAGATCACCCCCAGCCTGGCTGAGTTCTG
GCTTCAGCCTATACGCCAGCTGGCACACCAGTCCAAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCCAGTGAGCAT
CGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACAGTGAAATCCTGGAGGGCCTG
AATTTCAACGTCACGGAGATTCGGGAGGCTCAGGTCCATGAAGGCTTCCAGGAACCTCTCCATACCCCTCA
ACAAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCAACCGGCAACGGCCTGTTCTCAACAAGAGCCTGAAGGTAGT
GGATAAGTTTTGGAGGATGTCAAAAACTGTACCACTCAGAAGCCTTCTCTGTCAACTTTGAGGACACC
GAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACAATTACGTGGAGAAGGAACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCA
AGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAATGGGAGAGACC
CTTTGACGTTGAGGCCACCAAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAAGGCACCAACCGTGAAGGTGCCCATG
ATGAGGCGTTTAGGCATGTTTAAACATCTACCACTGTGAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAAT
ACCTGGGCAATGCCACGCCATCTTCTTCTGCCTGATGAGGGGAACTGCAGCACCTGGAAAATGAACT
CACCCATGATATCATCACCAAGTTCTTGAAAATGAAAACAGCAGGTCTGCCAACTTACATTTACCCAGA
CTGGCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGACAGTCTGGGCCACCTGGGTATCACTAAGGTCTTCAGCA
ATGGGGTGACCTCTCGGGGATCACGGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGT
GCTGACCATCGATGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGTCTATT
CCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCCTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCT
TCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAGAAATAACTGCCTGTCACTCCTCAGCCCCCTCCCTCCATCCC
TGGCCCCCTCCCTGAATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCGTGTGTGACTGCAAC

Figura 8N

SEQ ID NO:15

Complemento inverso de SEQ ID NO: 1

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAAGTTGAACATCATA
 CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
 CTGTTCAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTCTATCCTAGGGGGCTTG
 GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTGAAGGCTGTCAAGTGAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
 TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACTA
 TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
 ATTCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
 GGCTGTCTTCAGCTAGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTGTCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
 GACTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTTCAGGAACAGCCTCCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
 CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
 AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGGCAATGGCCTT
 CCTGAGCCATCAGCAGGCCTATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
 TGCTGGGCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCCTCTTCTATCTGGGGAGAAG
 GGACCTGATTCTAAACGGAGATATGTGAGGCTTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
 TTGTTGCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
 GGCCCGAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
 CAAACTTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
 CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
 CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCCTCCCTGTGATTCTCTTCTGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
 TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTTCAGTCCCCCTGGATTCAAGCCAGCA
 TGTGCTTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCGAAGACAGCACTGTTACCTGGAGCCAC
 ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
 AGCTCAACCTTCTTTAATGTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGAG
 TTATTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTCAATCATTAAAGA
 CAAAGGGTTTGTGAACCTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
 TCAGTCCCTTTCGTCTGATGGTCAGCAGCAGCCTTATGCACGGCCTTGAGAGGCTTCAGGGGTGCCTCCTCTGT
 GACCCCGAGAGGTGAGCCCATTTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
 AGGTTCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTCCAGGAACCTTGGTG
 ATGATATCGTGGGTGAGTTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
 ATTGCCCAAGGTATTTTCATCAGCAGCAGCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCATAAC
 GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTTCTCGGTGTCTTGAATTCA
 AAGGGTCTCTCCATTTGCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAACATGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
 GACCAATCCACAATTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGT
 CCCGAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
 AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
 GAGTTCTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
 CATCGTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
 ATATTGGTGTCTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
 CTGTGTAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCTGGGGATCCT
 CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
 GTCGATTCACTGTCCAGGTGAGTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCGTCCGTATTTAA
 GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCAGTTATCGGAGGAG
 CAAACAGGGGCTAAGTCCACTGGCTGGGATCTGAGTCGCCCGCTACGCTGCCCGGACGCTTTGCCTGGGCAGT
 GTACAGCTTCCACTGCCTTACCAGAAAGGATCATTGT

Figura 80

ES 2 676 146 T3

SEQ ID NO:16

Complemento inverso de SEQ ID NO: 2

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAAGTTGAACATCATA
CCAACTCAAAGGCAGGCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
CTGTTCAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTATCCTAGGGGGCTTG
GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTAAAAGGCTGTCAAGTGAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACTA
TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
ATTCCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
GGCTGTCCCTTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTGTCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
GACTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTACAGAACAGCCTCCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCCCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCCCTTGCATAGGCCTT
CCTGAGCCATCAGCAGGCTATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
TGCTGGGCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCCTCTTCTATCTGGGGAGAAG
GGACCTGATTCTAAACGAGATATGTAGGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
TTGTGTCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
GGCCCCAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
CAAACTTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCCCTCCCTGTGATTCTCTTCTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTTCAGTCCCCCTGGATTCAAGCCCAGCA
TGTGCCATGCCACGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCCCAGGAGGAGCACTGTTACCTGGAGCCAC
ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
AGCTCAACCCCTTTCTTAATGTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGAG
TTATTTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTCAATCATTAAAGAAGA
CAAAGGGTTTGTGAAGTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
TCAGTCCCTTTCTCGTGCATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGAGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCTGT
GACCCCGAGAGGTGAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
AGGTTCAGTAATGGACAGTTTGGGTAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTCCAGGAAGTTGGTG
ATGATATCGTGGGTGAGTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
ATTGCCCAGGTATTTTCATCAGCAGACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCATAAC
GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTTCTCGGTGTCCTTGACTTCA
AAGGGTCTCTCCCATTTGCCCTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
GACCAATCCACAATTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGT
CCCCGAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
GAGTTCCTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
CATCGTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAAGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
ATATTGGTGTCTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
CTTGTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCTGGGGATCCT
CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
GTCTTTCTCTGTCTCTCAAGCTCTCTCAAGCTCTGTCTTCTGGCAGGCACAGGAGAGTGGCTGAAGGC
TGGCAGGAGGTTGCCGCCCTCCAACCTGGAATTCTGGCAGCAGCAGCGGCTAGGCCTTCTCGGAGGGCCGA
CCCCCTCTCTCTTGTGTTAGCTCAGGACTCTGAGGGTTGCTGCGTGGAGGCAGTGCATGCCCTGGGCACAG
TGCCAGTTCCTGCCCA

Figura 8P

SEQ ID NO:17

Complemento inverso de SEQ ID NO: 3

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTTATTCTCTGTCTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAAGTTGAACATCATA
 CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
 CTGTTCAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTCTATCCTAGGGGGCTTG
 GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTGAAGGCTGTCAAGTGAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
 TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACTA
 TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAAGTGGTTAGACAGTG
 ATTCCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
 GGCTGTCTTTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTCTCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
 GACTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTTCAGGAACAGCCTCCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
 CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAAAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
 AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGCATAGGCCTT
 CCTGAGCCATCAGCAGGCCTATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
 TGCTGGGCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCCTCTTCTATCTGGGGAGAAG
 GGACCTGATTCTAAACGGAGATATGTGAGGCTTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
 TTGTTGCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
 GGCCCGAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
 CAAACTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
 CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
 CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCCCTCCCTGTGATTCTCTTCTGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
 TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTTCAGTCCCCCTGGATTCAAGCCAGCA
 TGTGCCCTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCGAAGACAGCACTGTTACCTGGAGCCAC
 ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
 AGCTCAACCTTCTTTAATGTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGAG
 TTATTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTCAATCATTAAAGA
 CAAAGGGTTTGTGAAGTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
 TCAGTCCCTTTCTCGTCGATGATGATCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCTGT
 GACCCCGAGAGGTGAGCCCATTTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
 AGGTTCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCAATTTCCAGGAAGTTGGTG
 ATGATATCGTGGGTGAGTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
 ATTGCCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGTGGATGTTAAACATGCCATAAC
 GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTTCTCGGTGTCTTGAAGTTCA
 AAGGGTCTCTCCATTTGCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
 GACCAATCCACAATTTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCTCTTCCGGTGT
 CCCGAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAAGTTTAAACATCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
 AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
 GAGTTCTGGAAGCCTTCATGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
 CATCGTGAAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
 ATATTGGTGTCTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
 CTGTGTTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCTGGGGATCCT
 CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
 GTCGATTCACTGTCCAGGTGAGTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCGTCCGTATTTAA
 GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCTGCGAAAGGAGTCAATGTACCTGGCTCAGAAACACAGCGTCC
 TGTGTCCAAGGTGGAGGGGGTGGCGTGAGTCAGACAGTCTCTGGGAGAGTACCATTAGCTGGCCCTGTGCTCT
 CACTGCAGAATCCTTAGTGGCTGTTCCACTGGTAGCAAGATCTACCATTACTGAGTCACCCAAAAATGCCTGA
 TGCTGAAGACTTACTGCCGCCCTTCTCTGCTCTCTCAAGCTCTCTCAAGCTCTGTCTTCTTGGCAGGCACA
 GGAGAGTGGCCTGAAGGCTGGCAGGAGGTTGCCGCCCTCCAACCTGGAATTCTTGGCAGCAGCAGCGGCTAGG
 CCTTCTCGGAGGCCGACCCCTCTCTCTTCTTGGTTGAGTTCAGCTCAGGACTCTGAGGTTGTGCTGCTGGAGGCAG
 TGCATGCCCTGGGCACAGTGGCCAGTTCTTGCCCA

Figura 8Q

ES 2 676 146 T3

SEQ ID NO:18

Complemento inverso de SEQ ID NO: 4

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAAGTTGAACATCATA
CCAACTCAAAGGCAGGCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
CTGTTCAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTATCCTAGGGGGCTTG
GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTAAAAGGCTGTCAAGTGAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACTA
TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
ATTCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
GGCTGTCCCTTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTGTCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
GACTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTACAGAACAGCCTCCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGCATAGGCCTT
CCTGAGCCATCAGCAGGCCTATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
TGCTGGGCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCTCTCATCTGGGGAGAAG
GGACCTGATTCTAAACGAGATATGTAGGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
TTGTGTCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
GGCCCCAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
CAAACTTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCCCTCCCTGTGATTCTCTTCTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTGAGTCCCCCTGGATTCAAGCCCAGCA
TGTGCCCTAGCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCCCAGGAGGACGACTGTTACCTGGAGCCAC
ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
AGCTCAACCCCTTTTAAATGTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGAG
TTATTTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTCAATCATTAAAGA
CAAAGGGTTTGTGAAGTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
TCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGAGAGGCTTCAGGGGTGCCTCCTCTGT
GACCCCGAGAGGTGAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
AGGTTCAGTAATGGACAGTTTGGGTAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTCCAGGAAGTTGGTG
ATGATATCGTGGGTGAGTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
ATTGCCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCATAAC
GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTTCTCGGTGTCTTGAATTCA
AAGGGTCTCTCCCATTTGCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
GACCAATCCACAATTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCTCTTCCGGTGT
CCCCGAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
GAGTTCCTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
CATCGTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
ATATTGGTGCTGTTGAGTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
CTTGTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCTGGGGATCCT
CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
GTCTGTGGAAGTGAAGTGAAGCAGCAGCAATGTCCACCTTTCTGTCTCTCAAGCTCTCCTCAAGCTCT
GTCTCTTCTGGCAGGCACAGGAGAGTGGCTGAAGGCTGGCAGGAGGTTGGCGCCCTCCAACCTGGAATTCCT
GGCAGCAGCAGCGCTAGGCCTTCTCGGAGGCCGACCCCTCTCTCTTCTTGGTTCAGCTCAGGACTCTGAG
GGTTGCTGCTGGAGGAGTGCATGCCCTGGGCACAGTGCCAGTTCTCTGCCCA

Figura 8R

ES 2 676 146 T3

SEQ ID NO:19

Complemento inverso de SEQ ID NO: 5

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAAACATTTTGTATCTAAGTTGAACATCATA
CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
CTGTTCAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTATCCTAGGGGGCTTG
GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTAAAGGCTGTCAAGTGAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACTA
TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
ATTCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
GGCTGTCTTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTGTCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
GACTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTTCAGGAACAGCCTCCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAACTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGCATAGGCCTT
CCTGAGCCATCAGCAGGCCTATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
TGCTGGGCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCCTCTTCTATCTGGGGAGAAG
GGACCTGATTCTAAACGAGATATGTAGGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
TTGTGTCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
GGCCCCAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
CAAACTTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCCCTCCCTGTGATTCTCTTCTGGGGAAGTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTGAGTCCCCCTGGATTCAAGCCCAGCA
TGTGCTTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCCCAGGACAGCACTGTTACCTGGAGCCAGC
ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
AGCTCAACCTTCTTTAATGTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGGAG
TTATTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTCAATCATTAAAGAAGA
CAAAGGGTTTGTGAAGTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
TCAGTCCCTTTCTCGTTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCTGT
GACCCCGAGAGGTGAGCCCCATTGTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
AGGTTCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCAATTTCCAGGAAGTGGTG
ATGATATCGTGGGTGAGTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
ATTGCCCAGGTATTTATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCATAAC
GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTTCTCGGTGTCTTGAAGTTCA
AAGGGTCTCTCCATTTGCCCTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
GACCAATCCACAATTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCTCTTCCGGTGT
CCCCGAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAAGTTTAAACATCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
GAGTTCTTGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
CATCGTGAAGTGTAGCCTTGGTCCCCAGGAGAGCATTCGAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
ATATTGGTGTCTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
CTTGTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCTGGGGATCCT
CAGCCAGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCAGGACAGAAGACGGCATT
GTCGATTCACTGTCCAGGTGAGTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCGTCCGTATTTAA
GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCTGCTGGCTCAGAAACCACAGCGTCTGTGTCCAAGGTGGAGGG
GGTGGCTGAGTCAGACAGTCTCTGGGAGAGTACCCTTAGCTGGCCCTCTGCTCTCACTGCAGAATCCTTAGT
GGCTGTTCCACTGGTAGCAAGATCTACCATTTACTGAGTCACCCCAAAATGCCTGATGCTGAAGACTTACTGCC
GCCCTGTGGAAGTGAAGTGAAGCAGCAGCAATGTCCACCTTTCTGTCTCTCTCAAGCTCTCTCAAGCTCT
GTCTCTTCTGGCAGGCACAGGAGAGTGGCCTGAAGGCTGGCAGGAGGTTGCCGCCCTCCAACCTGGAATTCCT
GGCAGCAGCAGCGGTAGGCCTTCTCGGAGGCCGACCCCTCCTCTTCTTGGTTAGCTCAGGACTCTGAG
GGTTGCTGCGTGGAGGACAGTCATGCCCTGGGCACAGTGCCCAAGTTCTTGCCCA

Figura 8S

ES 2 676 146 T3

SEQ ID NO:20

Complemento inverso de SEQ ID NO: 6

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAAGTTGAACATCATA
CCAACTCAAAGGCAGGCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
CTGTGAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTATCCTAGGGGGCTTG
GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTAAAAGGCTGTCAAGTGAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACTA
TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAAGTGGTTAGACAGTG
ATTCCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
GGCTGTCTTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTGTCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
GACTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTACAGAACAGCCTCCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAACTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGCATATGGCCTT
CCTGAGCCATCAGCAGGCTATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
TGCTGGGCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCCTCTTCTATCTGGGGAGAAG
GGACCTGATTCTAAACGAGATATGTAGGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
TTGTGTGCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
GGCCCCAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
CAAACTTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCCCTCCCTGTGATTCTCTTCTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTGAGTCCCCCTGGATTCAAGCCCAGCA
TGTGCTTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCCCAGGAGGAGCAGTGTACCTGGAGCCAC
ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
AGCTCAACCCCTTCTTAATGTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGAG
TTATTTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTCAATCATTAAAGAAGA
CAAAGGGTTTGTGAAGTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
TCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCTGT
GACCCCGAGAGGTGAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
AGGTTCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTCCAGGAAGTTGGTG
ATGATATCGTGGGTGAGTTTATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
ATTGCCCAGGTATTTATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGTGGATGTTAAACATGCCATAAC
GCTTCATCATAGGCACCTTACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTCTCTCGGTGTCTTGAAGTTCA
AAGGGTCTCTCCATTTGCCCTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
GACCAATCCACAATTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCTCTTCCGGTGT
CCCCGAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAAGTTTAAACATCCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
GAGTTCCTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
CATCGTGAAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTCGCAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
ATATTGGTGTCTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
CTTGTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCTTGGGGATCCT
CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
GTCGATTCACTGTCCAGGTGAGTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCTCGTCCGTATTTAA
GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCTGCTGTGGAAGTGAAGTGAAGCAGCAGCAATGTCCACCTTT
CCTGCTCTCCTCAAGCTCTCTCAAGCTCTGTCTTCTGGCAGGCACAGGAGAGTGGCCTGAAGGCTGGCAGG
AGGTTGCCGCCCTCCAACCTGGAATTCCTGGCAGCAGCAGCGGCTAGGCCTTCTCGGAGGGCCGACCCCTC
CTCCTTCTTGGTTGAGCTCAGGACTCTGAGGGTTGCTGCTGGAGGCAGTGCATGCCCTGGGCACAGTGCCAG
TTCTTGCCCA

Figura 8T

ES 2 676 146 T3

SEQ ID NO:21

Complemento inverso de SEQ ID NO: 7

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAAACATTTTGTATCTAACTTGAACATCATA
CCAACTCAAAGGCAGGCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
CTGTTCAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTATCCTAGGGGGCTTG
GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTAAAAGGCTGTCACTGAGTAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACTA
TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
ATTCCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
GGCTGTCTTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTGTCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
GACTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTTCAGGAACAGCCTCCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGCATATGGCCTT
CCTGAGCCATCAGCAGGCTATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
TGCTGGGCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCCTCTTCTATCTGGGGAGAAG
GGACCTGATTCTAAACGAGATATGTAGGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
TTGTGTCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
GGCCCCAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
CAAACTTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCCCTCCCTGTGATTCTCTTCTGGGGAAGTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTTCAGTCCCCCTGGATTCAAGCCCAGCA
TGTGCTTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCCCAGGAGGAGCAGTGTACCTGGAGCCAC
ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
AGCTCAACCTTCTTTAATGTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGGAG
TTATTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTCAATCATTAAAGAAGA
CAAAGGGTTTGTGAACCTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
TCAGTCCCTTTCTCGTTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTGT
GACCCCGAGAGGTGAGCCCCATTGTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
AGGTTCAGTAATGGACAGTTTGGGTAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTCCAGGAAGTGTGGT
ATGATATCGTGGGTGAGTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
ATTGCCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCATAAC
GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTTCTCGGTGTCTTGAATTCA
AAGGGTCTCTCCATTTGCCCTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
GACCAATCCACAATTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCTCTTCCGGTGT
CCCCGAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
GAGTTCCTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
CATCGTGAGTGTAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTCGAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
ATATTGGTGTCTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
CTTGTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCTGGGGATCCT
CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
GTCGATTCACTGTCCAGGTGAGTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCGTCCGTATTTAA
GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCTGCTGGCTCAGAAACCACAGCGTCTGTGTCCAAGGTGGAGGG
GGTGGCGTGAGTCAGACAGTCTCTGGGAGAGTACCCTTAGCTGGCCCTCTGCTCTCACTGCAGAATCCTTAGT
GGCTGTTCCACTGGTAGCAAGATCTAGCATTACTGAGTCACCCCAAAATGCCTGATGCTGAAGACTTACTGCC
GCCCTTCTCTGCTCTCTCAAGCTCTCTCAAGCTCTGCTCTTCTGGCAGGCACAGGAGAGTGGCCTGAAGGC
TGGCAGGAGGTTGCCGCCCTCCAACCTGGAATTCCTGGCAGCAGCAGCGGCTAGGCCCTCCTCGGAGGCCCGA
CCCCCTCTCTCTTCTTGGTTAGCTCAGGACTCTGAGGGTTGCTGCGTGGAGGCAGTGCATGCCCTGGGCACAG
TGCCAGTTCTTGCCCA

Figura 8U

SEQ ID NO:22

Complemento inverso de SEQ ID NO: 8

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAAGTTGAACATCATA
 CCAACTCAAAGGCAGGCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
 CTGTTCAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGCTTCAGACTCTCAGGCTCTGGTGTATCCTAGGGGGCTTG
 GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTAAAGGCTGTCAAGTGAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
 TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACTA
 TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
 ATTCCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
 GGCTGTCTTCAGCTAGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTGTCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
 GACTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTACAGAACAGCCTCCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
 CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAACTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
 AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGCATAGGCCTT
 CCTGAGCCATCAGCAGGCTATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
 TGCTGGGCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCTCTCATCTGGGGAGAAG
 GGACCTGATTCTAAACGAGATATGTAGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
 TTGTGTCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
 GGCCCGAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
 CAAAACCTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
 CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
 CTGGGGTCAATGGCTGGTATCTGGTTCCCTCCCTGTGATTCTCTTCTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
 TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTGAGTCCCCCTGGATTCAAGCCCAGCA
 TGTGCTTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCCCAGGAGGACGCACTGTTACCTGGAGCCAC
 ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
 AGCTCAACCCCTTTTAAATGTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGAG
 TTATTTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTCAATCATTAAGAAGA
 CAAAGGGTTTGTGAACCTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
 TCAGTCCCTTTCTCGTTCATGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCTGT
 GACCCCGAGAGGTGAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
 AGGTTCAGTAATGGACAGTTTGGGTAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTCCAGGAACCTTGGTG
 ATGATATCGTGGGTGAGTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
 ATTGCCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCATAAC
 GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTCTCTCGGTGTCTTGAATTCA
 AAGGGTCTCTCCATTTGCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
 GACCAATCCACAATTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCTCTTCCGGTGT
 CCCGAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
 AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
 GAGTTCCTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
 CATCGTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATGCAAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
 ATATTGGTGTCTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
 CTTGTTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATAGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCTGGGGATCCT
 CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
 GTCGATTCACTGTCCAGGTGAGTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCTGCTCCGTATTTAA
 GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCTGGCTCAGAAACCACAGCGTCTGTGTCCAAGGTGGAGGGGT
 GGCTGAGTCAGACAGTCTCTGGGAGAGTACCATTAGCTGGCCCTCTGTCTCACTGCAGAACTCTTAGTGGC
 TGTTCACCTGGTAGCAAGATCTACCATTACTGAGTCACCCAAAATGCCTGATGCTGAAGACTTACTGCCGCC
 CTTTCTGTCTCTCAAGCTCTCTCAAGCTCTGTCTCTTCTGGCAGGCACAGGAGAGTGGCTGAAGGCTGG
 CAGGAGGTTGCCGCCCTCCAACTGGAATTCCTGGCAGCAGCAGCGGTAGGCCTTCTCGGAGGGCCGACCC
 CCTCTCTCTTCTGGTTACAGTCAGGACTCTGAGGGTGTGCTGCTGGAGGCAGTGCATGCCCTGGGCACAGTGC
 CCAGTTCTGCCCA

Figura 8V

ES 2 676 146 T3

SEQ ID NO:23

Complemento inverso de SEQ ID NO: 9

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTTATTCTCTGTCTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAAGTTGAACATCATA
CCAACTCAAAGGCAGGCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
CTGTTCAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTATCCTAGGGGGCTTG
GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTAAAAGGCTGTCAAGTGAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACTA
TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
ATTCCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
GGCTGTCTTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTGTCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
GACTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTACAGAACAGCCTCCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAACTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGCATAGGCCTT
CCTGAGCCATCAGCAGGCCTATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
TGCTGGGCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCCTCTTCTATCTGGGGAGAAG
GGACCTGATTCTAAACGAGATATGTAGGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
TTGTGTCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
GGCCCCAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
CAAACTTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCCCTCCCTGTGATTCTCTTCTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTGAGTCCCCCTGGATTCAAGCCCAGCA
TGTGCCATGCCACGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCCCAGGACAGCACTGTTACCTGGAGCCAC
ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
AGCTCAACCCCTTCTTTAATGTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGAG
TTATTTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTCAATCATTAAAGAAGA
CAAAGGGTTTGTGAAGTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
TCAGTCCCTTTCTCGTTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCTGT
GACCCCGAGAGGTGAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
AGGTTCAGTAATGGACAGTTTGGGTAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCAATTTCCAGGAACCTTGGTG
ATGATATCGTGGGTGAGTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
ATTGCCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCTAAAC
GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTCTCTCGGTGTCTTGAATTCA
AAGGGTCTCTCCATTTGCCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
GACCAATCCACAATTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGT
CCCCGAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
GAGTTCCTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
CATCGTGAGTGTAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
ATATTGGTGTCTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
CTTGTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCTTGGGGATCCT
CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
GTCGATTCACTGTCCAGGTGAGTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCTCGTCCGTATTTAA
GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCGAAAGGAGTCAATTGTACCTGGCTCAGAAACCACAGCGTCTGT
GTCCAAGGTGGAGGGGGTGGCGTGAGTCAGACAGTCTCTGGGAGAGTACCATTAGCTGGCCCTCTGTCTCAGC
TGCAGAATCCTTAGTGGCTGTTCCACTGGTAGCAAGATCTACCATTACTGAGTCACCCCAAAATGCCTGATGC
TGAAGACTTACTGCCGCCCTTTCCTGTCTCTCTCAAGCTCTCTCAAGCTCTGTCTCTTCTGGCAGGCACAGGA
GAGTGGCCTGAAGGCTGGCAGGAGGTTGCCGCCCTCCAACTTGAATTCCTGGCAGCAGCAGCGGCTAGGCCT
TCCTCGGAGGGCCGACCCCTCTCTCTTCTTGGTTAGCTCAGGACTCTGAGGGTTGCTGCGTGGAGGCAGTGC
ATGCCCTGGGCACAGTGCCAGTTCTCTGCCCA

Figura 8W

ES 2 676 146 T3

SEQ ID NO:24

Complemento inverso de SEQ ID NO: 10

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAACTTGAACATCATA
CCAACTCAAAGGCAGGCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
CTGTTCAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTATCCTAGGGGGCTTG
GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTAAAAGGCTGTCAAGTGAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACTA
TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
ATTCCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
GGCTGTCTTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTGTCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
GACTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTTCAGGAACAGCCTCCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAAGTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGCATAGGCCTT
CCTGAGCCATCAGCAGGCTATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
TGCTGGGCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCTCTCATCTGGGGAGAAG
GGACCTGATTCTAAACGAGATATGTAGGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
TTGTGTGCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
GGCCCCAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
CAAACTTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCTCCCTGTGATTCTCTTCTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTAGTCCCCCTGGATTCAAGCCCAGCA
TGTGCTTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCCCAGGAGGACGACTGTTACCTGGAGCCAC
ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
AGCTCAACCTTCTTTAATGTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGGAG
TTATTTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTCAATCATTAAAGAAGA
CAAAGGGTTTGTGAACCTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
TCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGAGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCTGT
GACCCCGAGAGGTGAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
AGGTTCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTCCAGGAACCTTGGTG
ATGATATCGTGGGTGAGTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
ATTGCCCAGGTATTTATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCTAAAC
GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTCTCTCGGTGTCTTGAATTCA
AAGGGTCTCTCCCATTTGCCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
GACCAATCCACAATTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCTCTTCCGGTGT
CCCCGAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
GAGTTCCTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
CATCGTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAAGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
ATATTGGTGTCTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
CTTGTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCTGGGGATCCT
CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
GTCGATTCACTGTCCAGGTGAGTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCTCGTCCGTATTTAA
GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCTGCTTTCCTGCTCTCCTCAAGCTCTCCTCAAGCTCTGTCTCTT
CTGGCAGGCACAGGAGATGGCTGAAGGCTGGCAGGAGTTGCCGCCCTCCAACTGGAATTCCTGGCAGCA
GCAGCGGCTAGGCCTTCTCGAGGGCCGACCCCTCCTCCTTCTTGGTTCAGCTCAGGACTCTGAGGGTTGCT
GCGTGGAGGCAGTGCATGCCCTGGGCACAGTGCCAGTTCTCTGCCCA

Figura 8X

ES 2 676 146 T3

SEQ ID NO:25

Complemento inverso de SEQ ID NO: 11

TGCAAGAAATGTAGTTCTATTTATTCTCTGTTCTAATGGGTATAAACATTTTGTATCTAACTTGAACATCATA
CCAACTCAAAGGCAGGTCTTACTAGCAATGACTGGGGCTCAGAGAGGTTTGGCGACTTCACGAAGGTCACACAG
CTGTTCAGGGGGAAAAGTCAGAACTTGGATCCAGGTCTTCAGACTCTCAGGTCTGGTGTATCCTAGGGGGCTTG
GTGATGGCCATATCTTTAATGTATTTGTGGAGAGTAAAAGGCTGTCAAGTGAAGCTTAAGAGAACAGGAGAC
TTGTGTGGGAAACAGTCGGTATCCATTGATTAGACTGAATCATGTAGAATTGCTAATTTACCATTTTGAACTA
TCGAAATCACTATTTGGTATGACTCAACCTCATCCTTTAAGTACACATTTCATGACAGTGAGTGGTTAGACAGTG
ATTCTAGATTAGTTTGGGATGGGGCAGTGCCTTCCATAGGACAAGGCCATTCTGGTAGAGACGGAGGGAGCA
GGCTGTCTTCAGCTAGGGGGCCAGGGGACTTCCTGGCTGCTGTGTCTTTAGCAGGGCCTTGGAGGATGGAAG
GACTCTCTGGCCCTTACCACAGGGGCTATTTCAGGAACAGCCTCCTGCCGTGGCACTGGAGCTGCGGTGGCCCT
CTGAAGACTGCAGGGACAGCAACAGGCACAAAGAACTCAGGCTGCATGTGGCCCCAGTCGGGACTCAGAGGAGG
AAAGGGAGGGGTTGCGGGGGTCAATGGGTGATGTGCTTCTCTCCCATAGCTGAGGAGTCTTGCATAGGCCTT
CCTGAGCCATCAGCAGGCCTATGGCCATGTGACTAGGGAGGAGAAGGGATATAGGGTAATGGTCTTCTGGGGCC
TGCTGGGCTGGTCAAGTCTGAGGAGGAGATAGAGAAAACAAAGCAGAGACCCCTCTCTCATCTGGGGAGAAG
GGACCTGATTCTAAACGAGATATGTAGGGCTTCTGGGGCAGCGATGGAAGGACAAGGACAGAATAGGTGTCC
TTGTGTCCCCATGGAGAATGGGCTTCAGGAAGAATCTGCCTCAGTCATTTTCCAGAAGTGCCTGAGAGGTGCAG
GGCCCCAGTCTGGTTAGGTGACAGCGGGTCAAGAGGAGGACATTGTCTCTCTTGTGTTGCTGCAGATGCCA
CAAACTTGGGCCACGGCACGATCAGGCAGTTCTGGGGCCCCAGGAGGGCAGCCTTGGGGTGGGCACAGCCAGC
CCTGGCAGGATGAGCAACTCTGGGTGGGGGGAGTGGGGGATGAGCAGGGGGACATGAAGATGCTTGGTGGAGC
CTGGGGTCATGGCTGGTATCTGGTTCCCTCCCTGTGATTCTCTTCTGGGGACTCCAAGACAGGACAAGGAAGAC
TGGAGCCCTCCAGAAACAGATGGGCCAGGTCCGTAAGCTGAGGATTAGTCCCCCTGGATTCAAGCCCAGCA
TGTGCTTACCCAGCCAGATGCTCCATGAACACAGTTTCAGGGGGCCCCAGGAGGACGACTGTTACCTGGAGCCAC
ATACAGCCTCAGCAGGCAAGGGAGACTCAGAGAAAACATGGGAGGGATTACAGTCACATGCAGGCAGGGACC
AGCTCAACCCCTTTCTTAATGTATCCAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGTTGAGGAGCGAGAGGAG
TTATTTTTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTCAATCATTAAAGAAGA
CAAAGGGTTTGTGAACCTTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTATGGCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCT
TCAGTCCCTTTCTCGTCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGAGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCTGT
GACCCCGGAGAGGTGAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCAGTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCAT
AGGTTCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTAAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTCCAGGAACCTTGGTG
ATGATATCGTGGGTGAGTTCAATTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGC
ATTGCCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATGTTAAACATGCCTAAAC
GCTTCATCATAGGCACCTTCACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTCTCTCGGTGTCTTGAATTCA
AAGGGTCTCTCCCATTTGCCCTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACGTGTCTCTGTCAAGCTCCTT
GACCAATCCACAATTTCCCTTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGATCTGTTTCTTGGCTCTTCCGGTGT
CCCCGAAGTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACAACCTTTTAAACATCCTCCAAAACTTATCCACTAGCTTC
AGGCCCTCGCTGAGGAACAGGCCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAG
GAGTTCTTGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTT
CATCGTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAG
ATATTGGTGTCTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGGCGAACTCAGCCAGGTTGGGGGTGAT
CTTGTGAAGGTTGGGTGATCCTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGGGCAGCATCTCCTGGGGATCCT
CAGCCAGGGAGACAGGGACCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGATGCCCCACGAGACAGAAGACGGCATT
GTCGATTCACTGTCCAGGTGAGTGGTGGTGCCTGAAGCTGAGGAGACAGGGCCCTGTCTCTCGTCCGTATTTAA
GCAGTGGATCCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCTTTCCTGCTCTCCTCAAGCTCTCCTCAAGCTCTGTCTCTCTG
GCAGGCACAGGAGAGTGGCTGAAGGCTGGCAGGAGGTTGCCGCCCTCCAACCTGGAATTCTGGCAGCAGCA
GCGGCTAGGCCTTCTCGGAGGCCCGACCCCTCCTCTCTTGGTTACAGTCTCAGGACTCTGAGGGTTGCTGCG
TGGAGGCAGTGCATGCCCTGGGCACAGTGCCAGTTCTCTGCCCA

Figura 8Y

ES 2 676 146 T3

SEQ ID NO:26

Complemento inverso de SEQ ID NO: 12

ATGTCATT CAGGGAGGGGGCCAGGGATGGAGGGGAGGGGCTGAGGAGTGACAGGCAGTTATTTCTGGGTGGGAT
TCACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGGTATTTTGTTC AATCATTAAGAAGACAAAGGGTTTGTGAAC
TTGACCTCGGGGGGAATAGACATGGGTATGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCTTCAGTCCCTTCTCATC
GATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCCTTGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCCGTGATCCCCGAGAGGTCAG
CCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATACCCAGGTGGCCAGGACTGTCTTCAGATCATAGGTTCCAGTAATGGCC
AGTCTGGGTAAATGTAAGTTGGCAGACCTGCTGTTTTCATTTTCCAGGAACCTTGGTGATGATATCATGGGTGAG
TTCATTTTCCAGGTGCTGCAGTTTCCCCTCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGCATTGCCCAGGTATTTCA
TCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTCACAGTGGTAGATGTTAAACATGCCTAAACGCCTCATCATGGGCACC
TTCACGGTGGTCGCCTGGTCCACGTGGAAGTCTCTTCTTGGTGGCCTCAACGTCAAAGGGTCTCTCCCATTT
GCCTTTAAAGAAGATGTAATTCACCAGAGCAAAAACCTGTGTCTCTGTCAAGCTCCTTGACCAAATCCACAATTT
TCCCTTGAGTTTCTCTCCACGTAATTGTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGTCTCTCAAAGTTGACAGAG
AAGGCTTCTGAGTGGTACAGTTTTTTTGACATCCTCCAAAACTTATCCACTACCTTCAGGCTCTTGTGAGGAA
CAGGCCGTTGCCGTTGGTCAGCTGGAGCTGGCTGTCTGGCTTGTGAGGGTATGGAGGAGTTCTGGAAGCCTT
CATGGACCTGAGCCTCCGGAATCTCCGTGACGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTTCACTGTGAGTGTACGCC
TTGTTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAGGCTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAGAAGATATTGGTGTCTTGGGA
CTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTGAAGCCGAACTCAGCCAGGCTGGGGGTGATCTTGTGAGGGTTGGGT
GGTCTGATCATGGTGGGATGTATCCGTCTTCTGGGCAGCATCTCCCTGGGGATCCTCAGCCAGAGAGCCGGGG
AGCAGGCAGCACAGGCCTGCCAGCAGGAGGACGCCCATGAGACAGAAGATGGCATTGTCCTG

Figura 8Z

ES 2 676 146 T3

SEQ ID NO:27

Complemento inverso de SEQ ID NO: 13

GTTTGCAGTCACACACGCAGGCAGGGACCAGCTCAACCCTCTTTAATGTCATTACAGGAGGGGGCCAGGGATG
GAGGGGAGGGGCTGAGGAGTGACAGGCAGTTATTTCTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGA
CTTGGTATTTTGTCAATCATTAAAGAAGACAAAGGGTTTGTGAACTTGACCTCGGGGGGAATAGACATGGGTA
TGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCTTCAGTCCCTTTCTCATCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCC
TTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCCGTGATCCCCGAGAGGTCAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATACC
CAGGTGGCCCAGGACTGTCTTCAGATCATAGGTTCCAGTAATGGCCAGTCTGGGTAAATGTAAGTTGGCAGACC
TGCTGTTTTCATTTTCCAGGAACCTGGTGATGATATCATGGGTGAGTTCATTTTCCAGGTGCTGCAGTTTCCCC
TCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGCATTGCCAGGTATTTATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTC
ACAGTGGTAGATGTTAAACATGCCTAAACGCCCTCATCATGGGCACCTTCACGGTGGTCGCCCTGGTCCACGTGGA
AGTCTCTTCCTTGGTGGCTCAACGTCAAAGGGTCTCTCCCATTTGCCTTTAAAGAAGATGTAATTACCAGA
GCAAAACTGTGTCTCTGTCAAGCTCCTTGACCAAAATCCACAATTTCCCTTGAGTTTCCTTCTCCACGTAATT
GTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGTCTCAAAGTTGACAGAGAAGGCTTCTGAGTGGTACAGTTTTTTGA
CATCTCCAAAACTTATCCACTACCTTCAGGCTCTTGTGAGGAACAGGCCGTTGCCGGTGGTCAGCTGGAGC
TGGCTGTCTGGCTTGTGAGGGTATGAGGAGTTTCTGGAAGCCTTCATGGACCTGAGCCTCCGGAATCTCCGT
GACGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTTCACTGTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCCAGGGAGAGCATTGCAAAGG
CTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAGATATTGGTGTCTGTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTG
AAGCCGAACCTCAGCCAGGCTGGGGGTGATCTTGTGAGGGTTGGGTGGTCTGTATCATGGTGGGATGTATCCGT
CTTCTGGGCAGCATCTCCCTGGGGATCCTCAGCCAGAGAGCCGGGGAGCAGGCAGCACAGGCCCTGCCAGCAGGA
GGACGCCCCATGAGACAGAAGATGGCATTGTCGATTACCGTCCCAGGTCAGTGGTGGTGCCTGAGGCTGAGGA
GACAGAGCCCTGTCTTGTCCGTATTTAAGCAGTGGGTGCAGAGGGGCAACGGGGGAGGCTGCTGGTGAATATT
AACCAGATCACCCAGTTACCGGAGGAGCAAAACAGGGACTAAGTTACAGGCTGGGCCTGAGTCGCCCGCCC
ACGCTGTCCGGACGCTCTGCCTGAGCAGCATACAGCCTCCACTGCACGTACCAAAAGGAGTCATTGTACCTGGC
TCAGAAACCACAGTGTCTGCGTCCAAGGTGGAGGGGGTGGCGTGAGTCAGCCAGTCGCTGGGAGAGTACCACT
TTGCTGGCCCTCTGCTCTCACTGCAGAAATCCTTAGCGGCTGTTCCACTGGTAGCAAGATCTACCAATTTACTAAT
TCACCCGAAATGCCTGATGCTGAAGACTGATGCCGCCCTGGAATTCCTGGCAGCAGCAGTGGCTAGGCCTTCC
TCAGAGTGTCTGATCCCCCTCTCTCTTTGCTCAGCTCAGTACTCTGAGGGTTGCTGCGTGGAGGCAGTGCACG
CCCTGGGCACAGGGCCCAGTTCTTCCCACCCAGGAAGTTGGCCTCGGGTGGCGGGTGGCGGAGGCAATAGGTT
GGGGAGGGGCGGGGAGCTTGGGCAGGAAGGGGCCTTGCCCATTTGCCAGGCAGACACAAGACTGGGC

Figura 8AA

ES 2 676 146 T3

SEQ ID NO:28

Complemento inverso de SEQ ID NO: 14

GTTTGCAGTCACACACGCAGGCAGGGACCAGCTCAACCCCTCTTTAATGTCATTTCAGGAGGGGGCCAGGGATG
GAGGGGAGGGGCTGAGGAGTGACAGGCAGTTATTTCTGGGTGGGATTACCACTTTTCCCATGAAGAGGGGAGA
CTTGGTATTTTGTTCATCATTAAAGAAGACAAAGGGTTTGTGAACTTGACCTCGGGGGGAATAGACATGGGTA
TGGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCTTCAGTCCCTTTCTCATCGATGGTCAGCACAGCCTTATGCACGGCC
TTGGAGAGCTTCAGGGGTGCCTCCTCCGTGATCCCCGAGAGGTCAGCCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATACC
CAGGTGGCCCAGGACTGTCTTCAGATCATAGGTTCCAGTAATGGCCAGTCTGGGTAAATGTAAGTTGGCAGACC
TGCTGTTTTTCATTTTCCAGGAACCTGGTGATGATATCATGGGTGAGTTTCAATTTCCAGGTGCTGCAGTTTCCCC
TCATCAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGCATTGCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTC
ACAGTGGTAGATGTTAAACATGCCTAAACGCCCTCATCATGGGCACCTTCACGGTGGTCGCCTGGTCCACGTGGA
AGTCCTCTTCCTTGGTGGCTCAACGTCAAAGGGTCTCTCCCATTTGCCTTTAAAGAAGATGTAATTACCAGA
GCAAAACTGTGTCTCTGTCAAGCTCCTTGACCAAATCCACAATTTCCCTTGAGTTTCCCTTCCACGTAATT
GTTGATCTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGTCTCAAAGTTGACAGAGAAGGCTTCTGAGTGGTACAGTTTTTTGA
CATCTCCAAAACTTATCCACTACCTTCAGGCTCTTGTGAGGAACAGGCCGTTGCCGGTGGTCAGCTGGAGC
TGGCTGTCTGGCTTGTGAGGGTATGGAGGAGTTCTTGGAGCCTTCATGGACCTGAGCCTCCGGAATCTCCGT
GACGTTGAAATTCAGGCCCTCCAGGATTTCACTGTGAGTGTGAGCCTTGGTCCCAGGGAGAGCATTGCAAAGG
CTGTAGCGATGCTCACTGGGGAGAAGAAGATATTGGTGCTGTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGGTATAGGCTG
AAGCCGAACCTCAGCCAGGCTGGGGGTGATCTTGTGAGGGTTGGGTGGTCTGATCATGGTGGGATGTATCCGT
CTTCTGGGCAGCATCTCCCTGGGGATCCTCAGCCAGAGAGCCGGGAGCAGGCAGCACAGGCCCTGCCAGCAGGA
GGACGCCCCATGAGACAGAAGATGGCATTGTCCTGGAATTCCTGGCAGCAGCAGTGGCTAGGCCTTCCTCAGAG
TGCTGATCCCCCTCCTCCTCTTTGCTCAGCTCAGTACTCTGAGGGTTGCTGCGTGGAGGCAGTGCACGCCCTGG
GCACAGGGCCAGTTCTCTGCCACCCAGGAAGTTGGCCTCGGGTGGCGGGTGGCGGAGGCAATAGGTTGGGGAG
GGCGGGGAGCTTGGGCAGGAAGGGGCTTGCCATTGCCAGGCAGACACAAGA

Figura 8AB